

Diese Arbeit ist
meiner liebevollen Mutter Zenebech Beshah
und
meiner Verlobten Dörte Schüssler
gewidmet, zwei Menschen , die mir sehr viel bedeuten.



Genetische Analyse des Tyrosinkinase-Rezeptors ErbB2

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dipl. Biochemiker Masresha T. Woldeyesus
geb. 14.05.1966 in Äthiopien

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Hans Meyer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Bernhard Ronacher

Gutachter: 1. Prof. Dr. Harald Saumweber

2. PD. Dr. Clause Scheidereit

3. PD. Dr. Carmen Birchmeier

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.2001

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	7
1.1	DIE ERBB REZEPTOR-TYROSINKINASEN	8
1.2	DIE NEUREGULINE.....	10
1.3	SIGNALTRANSDUKTION DURCH NEUREGULINE UND ERBB REZEPTOREN	14
1.3.1	„CROSSTALK“ ZWISCHEN ERBB REZEPTOREN UND ANDEREN SIGNALWEGEN.....	17
1.4	BIOLOGISCHE FUNKTIONEN DES ERBB2 REZEPTORS.....	18
1.4.1	DIE FUNKTION VON ERBB2 IN DER HERZENTWICKLUNG.....	18
1.4.2	NEURALLEISTENZELLEN UND DAS PERIPHERE NERVENSYSTEM.....	19
1.5	SCHWANN’SCH E ZELLEN UND DIE SCHUTZHÜLLEN DER PERIPHEREN NERVEN.....	22
1.6	MOTONEURONEN UND NEUROMUSKULÄRE SYNAPSEN	23
1.6.1	MOTONEURONEN DES RÜCKENMARKS	23
1.6.2	MOTONEURONEN UND PERIPHERE SYNAPSEN	24
1.7	ZIEL DER ARBEIT	27
2	MATERIALIEN UND METHODEN.....	29
2.1	MATERIALIEN.....	29
2.1.1	ABKÜRZUNGEN.....	29
2.1.2	CHEMIKALIEN UND ENZYME.....	30
2.1.3	VERWENDETE WIRTS- UND VEKTORSYSTEME.....	30
2.1.4	MEDIEN, STANDARDPUFFER UND STANDARDLÖSUNGEN.....	30
2.2	METHODEN.....	32
2.2.1	PRÄPARATION VON DNA.....	32
2.2.1.1	Präparation von genomischer DNA.....	32
2.2.1.2	Mikropräparation von genomischer DNA aus ES-Zellen	33
2.2.1.3	Minipräparation von Plasmid-DNA (nach Birnboim, 1983).....	34
2.2.1.4	Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	35
2.2.2	HERSTELLUNG VON KOMPETENTEN E. COLI BAKTERIEN	37
2.2.2.1	Herstellung von kompetenten E. coli Bakterien (nach Hanahan, 1985)	37
2.2.2.2	Herstellung von kompetenten E. coli Bakterien (nach Inoue, 1990).....	39
2.2.3	PRÄPARATION VON RNA.....	40
2.2.4	SPEKTRALPHOTOMETRISCHE ERMITTLUNG DER NUKLEINSÄURE-KONZENTRATION.....	40
2.2.5	GELELEKTROPHORETISCHE VERFAHREN	41
2.2.5.1	DNA-Auftrennung in Agarosegelen.....	42
2.2.5.2	DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	42
2.2.6	PCR UND RT-PCR	43
2.2.7	RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA-SONDEN	46
2.2.8	SOUTHERN-BLOT-TRANSFER UND HYBRIDISIERUNG	47
2.2.9	ETABLIERUNG TRANSGENER MÄUSE	48
2.2.9.1	Kultur, Elektroporation und Selektion von ES-Zellen	48
2.2.9.2	Superovulation.....	49
2.2.9.3	Isolation von Blastozysten und Injektion von ES-Zellen	50
2.2.9.4	Uterustransfer von Blastozysten.....	50
2.2.10	IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....	51
2.2.10.1	Immunofluoreszenzen auf geschnittenen Geweben	51

2.2.10.2	Whole Mount Immunofluoreszenzen	52
2.2.10.3	Whole Mount Immunohistochemie	52
2.2.11	HISTOLOGISCHE METHODEN	53
2.2.11.1	Herstellen von Methacrylatschnitten	53
2.2.11.2	Herstellen von Kryoschnitten	53
2.2.11.3	Whole Mount in situ Hybridisierung.....	54
2.2.11.4	In situ Hybridisierung auf Gefrierschnitten.....	57
2.2.11.5	Histologische Färbmethoden	60
3	ERGEBNISSE.....	62
3.1	KONSTRUKTION DES „KNOCK IN“ TARGETINGVEKTORS	62
3.2	ETABLIERUNG VON MAUSLINIEN MIT DEM NKX-B2 ^{+/-} /B2 ^{-/-} GENOTYP	63
3.3	ÜBERLEBENSRATE VON GERETTETEN EMBRYONEN	65
3.4	DIE ESSENTIELLE FUNKTION VON ERBB2 IN DER HERZENTWICKLUNG	67
3.5	DAS FEHLEN VON SCHWANN'SCHEN ZELLEN AN DEN PERIPHEREN AXONEN.....	69
3.6	ERBB2 IM PERIPHEREN NERVENSYSTEM	72
3.6.1	FRÜHE DEFEKTE IN DEN SENSORISCHEN GANGLIEN UND NERVEN.....	72
3.6.2	VERÄNDERTE AXONALE MORPHOLOGIE UND DEGENERATION SENSORISCHER NEURONEN IN SPÄTEN STADIEN.....	73
3.6.3	DEFASZIKULIERUNG VON MOTONEURONEN UND DEREN SEGMENTSPEZIFISCHE DEGENERATION	76
3.6.4	ABNORMITÄTEN AN NEUROMUSKULÄREN ENDPLATTEN	81
4	DISKUSSION.....	85
4.1	DER ERBB REZEPTOR UND DIE ENTWICKLUNG VON SCHWANN'SCHEN ZELLEN	86
4.2	NEUREGULIN UND DIE ENTWICKLUNG VON NEUROGENEN NEURALLEISTENZELLEN....	88
4.3	NEURODEGENERATION IM PERIPHEREN NERVENSYSTEM.....	88
4.4	DEFASZIKULIERUNG VON PERIPHEREN NERVEN	91
4.5	DIE NEUROMUSKULÄREN SYNAPSEN	92
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	94
6	AUSBLICK.....	95
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	97

Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Schematische Darstellung von Rezeptor-Tyrosinkinasen.....	8
Abbildung 2: Die Klasse I Rezeptor-Tyrosinkinasen.....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Neuregulin-Gene.....	12
Abbildung 4: Aufbau des Nkx2.5 ^{ErbB2} Targetingvektors.....	63
Abbildung 5: Äußeres Aussehen und Histologie der Lunge von ErbB2-/-R Embryonen.....	67
Abbildung 6: Histologische Analyse des Herzen am Tag 10,5 und Tag 18,5 der Embryonalentwicklung.....	68
Abbildung 7: Das Fehlen von Schwann'schen Zellen bei den geretteten ErbB2-/-R sowie bei den ErbB3-/- Embryonen.....	70
Abbildung 8: Defekte in den Kranialganglien und -nerven der ErbB2-/-R Embryonen.	72
Abbildung 9: Morphologie der Spinalganglien und -nerven der geretteten ErbB2-/- Embryonen.	74
Abbildung 10: Morphologie und Degeneration von sensorischen Neuronen.	75
Abbildung 11: Morphologie der Axone von Motoneuronen am E15,5.	77
Abbildung 12: Degeneration des N. phrenicus und Defekte im Zwerchfell der ErbB2-/-R Embryonen.	79
Abbildung 13: Degeneration von motorischen Neuronen in den zervikalen, thorakalen und lumbalen Segmenten des Rückenmarkes.	80
Abbildung 14: Morphologie der Axone von Motoneuronen, die Verteilung der neuromuskulären Synapsen und die Abwesenheit von terminalen Schwann'schen Zellen am E18,5.....	82
Abbildung 15: Postsynaptische Genexpression bei den ErbB2-/-R und ErbB3-/- Embryonen am E18,5 der Embryonalentwicklung.....	84
Tabelle 1: Überlebensrate von ErbB2-/-R Embryonen zwischen Tag 10,5 und 18,5 der Embryonalentwicklung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

Die Gewebe, Organe und Organsysteme eines Säugetiers, die sich aus den Keimblättern entwickeln, haben ihren Ursprung in einer befruchteten Eizelle. Eine geordnete Entwicklung und die Organisation zu Geweben und Organsystemen setzt eine Kommunikation zwischen den Zellen voraus, die koordiniert ablaufen muß. Tierische Zellen können über „Gap Junctions“, die das Zytoplasma der in Wechselbeziehung stehenden Zellen direkt verbinden, miteinander kommunizieren. Kommunikation kann auch durch transmembrane Rezeptoren und ihre Liganden vermittelt werden. Beispiele für solche Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Rezeptoren mit Serin/Threonin-Kinaseaktivität, und Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität.

Rezeptor-Tyrosinkinasen sind allosterische Enzyme, die eine transmembrane Domäne besitzen, die die extrazellulär lokalisierte ligandenbindende Domäne von der intrazellulären Kinasedomäne trennt (Yarden und Ullrich 1988; Ullrich und Schlessinger 1990). In Abhängigkeit von der Bindung des Liganden wird die Tyrosinkinaseaktivität der Rezeptoren stimuliert, und die Rezeptoren werden auf Tyrosinresten phosphoryliert. Dies ist der erste Schritt in einer Signaltransduktionskette, die letztendlich zu Veränderungen in der Genexpression führt. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind etwa 70 verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen identifiziert worden, die aufgrund der strukturellen Merkmale der extrazellulären Domäne sowie der Sequenzhomologien der Kinasedomäne in 19 Subfamilien klassifiziert werden (Abb. 1; vgl. auch van der Geer et al. 1994).

Durch Rezeptor-Tyrosinkinasen und deren Liganden vermittelte Signale werden Zellwachstum, Motilität und/oder Differenzierung kontrolliert. Sie ermöglichen Zell-Zell-Interaktionen, die für die normale Embryonalentwicklung, aber auch im adulten Organismus für die Gewebemöostase und Regeneration notwendig sind. Dabei kann eine mutationsbedingte Aktivierung der Rezeptoren zu Tumoren führen,

während fehlende oder mangelhafte Aktivität eine gestörte Embryonalentwicklung oder Zelldegeneration im Adulten verursachen.

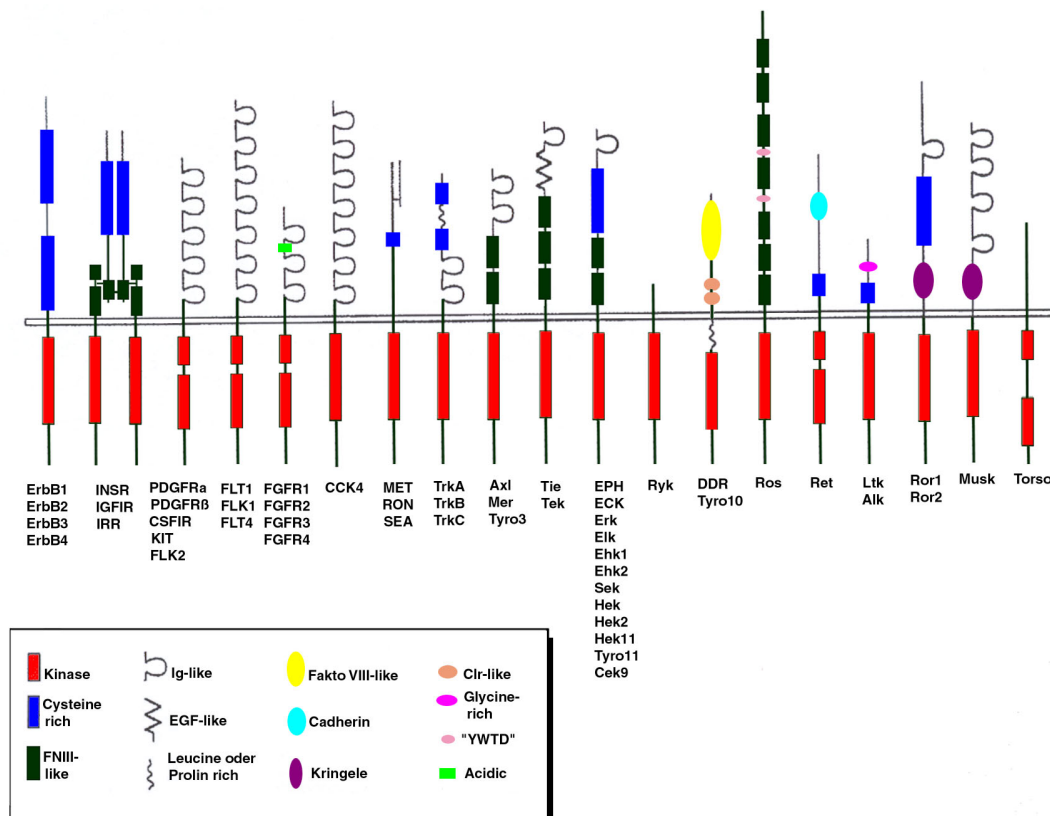


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Rezeptor-Tyrosinkinasen.

Dargestellt sind die verschiedenen Rezeptor-Tyrosinkinasen und ihre funktionellen Domänen. Die aus ErbB1 - ErbB4 bestehende Klasse I der Rezeptor-Tyrosinkinasen ist ganz links abgebildet. Die zysteinereiche ligandenbindende Domäne ist blau und die Kinase-Domäne rot dargestellt.

1.1 Die ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen

Die ErbB Rezeptoren bilden die Klasse I Rezeptor-Tyrosinkinasen, die in *Drosophila* aus einem Mitglied (*Drosophila* Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor, DER) und in Säugern aus vier Mitgliedern besteht, ErbB1 (Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor, EGF-Rezeptor), ErbB2 (c-neu; humaner Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor, HER-2), ErbB3 und ErbB4 (Hunter 1991; van der Geer

et al. 1994). Die Klasse I Rezeptor-Tyrosinkinasen weisen eine generell ähnliche Struktur auf (Abb. 2). Diese ist gekennzeichnet durch ein N-terminal lokalisiertes Signalpeptid und zwei zysteinreiche Sequenzabschnitte in der extrazellulären Region, die als ligandenbindende Domänen funktionieren. Die Transmembran-Domäne besitzt eine α -helikale Struktur und besteht aus 25-26 Aminosäuren, die überwiegend hydrophob sind. Die zytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren besitzen Sequenzhomologien zu Tyrosinkinasen. Während ErbB1 den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und eine Reihe von EGF-verwandten Faktoren (TGF- α , Betacellulin etc.) als Liganden erkennt, partizipieren ErbB2, ErbB3 und ErbB4 in der Signalübertragung von Neuregulinen, die im Mittelpunkt meiner Arbeit stehen. Wie ihre Liganden (siehe 1.2) werden auch die Neuregulin-Rezeptoren während der embryonalen Entwicklung exprimiert. In situ Hybridisierungs-Analysen zeigen, daß ErbB2 während der frühen Entwicklung sehr breit exprimiert wird (Meyer und Birchmeier, unpublizierte Daten, 1996). Auch in der perinatalen Phase und nach der Geburt wird ErbB2 breit exprimiert, z.B. im sich entwickelnden Nervensystem, in verschiedenen Epithelien und im Herzen (Kokai et al. 1987). ErbB3 wird früh in der Entwicklung in Neuralleistenzellen exprimiert (Meyer und Birchmeier 1995; Britsch et al. 1998). Danach wird die Expression in Muskelzellen, in verschiedenen Epithelien und in Gliazellen des zentralen und peripheren Nervensystems beobachtet (Prigent und Lemoine 1992).

Auch die Expression von ErbB4 ist schon früh in der Embryonalentwicklung im Herzen und in bestimmten Segmenten des Rautenhirns nachweisbar (Gassmann et al. 1995; Meyer und Birchmeier 1995). Später wird ErbB4 noch im Herzen, in Neuronen, im Muskel und in Epithelien exprimiert (Plowman et al. 1993).

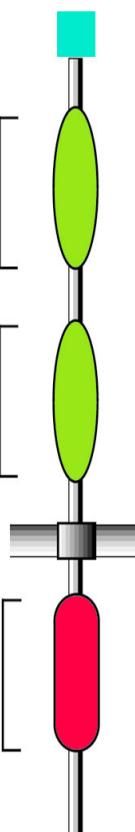




		<u>Sequenzübereinstimmung in %</u>			
		ErbB1	ErbB2	ErbB3	ErbB4
SP		42	38	48	
Cys-box 1		50	47	51	
		37	42	44	
Cys-box 2		45	53	52	
TM		76	49	78	
Kinase		83	58	80	
		23	8	28	

Abbildung 2: Die Klasse I Rezeptor-Tyrosinkinasen.

Schematisch dargestellt sind die Proteinstrukturen der Klasse I Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die Zahlen geben die prozentualen Sequenzübereinstimmungen, die zwischen den einzelnen Domänen der Rezeptoren festgestellt worden sind, wieder. Im Vergleich zu ErbB2 und ErbB4 zeigt ErbB3, außer der Cys II (Cys-box 2) Domäne, geringere Sequenzübereinstimmungen. Die Abkürzung SP steht für Signalpeptid; TM für Transmembran-Domäne (modifiziert nach Peles und Yarden 1993).

1.2 Die Neureguline

Neureguline sind eine Gruppe von membrangebundenen oder löslichen Wachstumsfaktoren, die als Liganden von ErbB Tyrosinkinase-Rezeptoren funktionieren. Bis jetzt wurden vier Neuregulin-Gene identifiziert (Abb. 3). Diese Gene zeigen Ähnlichkeiten in ihrer Sequenz und Genstruktur, wohingegen ihre prä- und postnatale Expression unterschiedlich ist.

Das bestuntersuchte Neuregulin-Gen ist Neuregulin-1 (NRG-1). Das NRG-1 Gen kodiert für ungewöhnlich viele (über 15) verschiedene Isoformen (Falls et al. 1993; Marchionni et al. 1993; Lemke 1996). Diese Vielfalt wird durch die Verwendung unterschiedlicher Promotoren und durch alternatives Spleißen erreicht. Alle Isoformen besitzen eine EGF-ähnliche Domäne, die allein für die Rezeptorbindung und -aktivierung ausreicht (Holmes et al. 1992). Die Vielfalt an Isoformen führte dazu, daß der Faktor von verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig identifiziert wurde, wobei unterschiedliche Nachweissysteme für die Aktivität von NRG-1 eingesetzt wurden. Die Fähigkeit, in Brust-Tumorzellen den ErbB2 Rezeptor zu phosphorylieren und Proliferation bzw. Differenzierung unterschiedlicher Zelllinien in Gang zu setzen, führte zur Isolierung von „Neu Differentiation Factor (NDF)“ (Peles et al. 1992; Wen et al. 1992) und „Heregulin“ (Holmes et al. 1992). Die Suche nach Faktoren mit mitogener Wirkung auf Schwann'sche Zellen führte zur Isolierung und Charakterisierung von „Glial Growth Factor (GGF)“ (Marchionni et al. 1993). Eine weitere Aktivität des Faktors, die Induktion der postsynaptischen Genexpression von Acetylcholin (ACh)-Rezeptor-Untereinheiten in Muskelzellen führte zur seiner Isolation als „Acetyl Choline Receptor Inducing Activity (ARIA)“ (Falls et al. 1993). Weitere Isoformen, die durch cDNA Klonierung identifiziert wurden, werden „Sensory and Motoneuron Derived Factor (SMDF)“ oder neurales (n-) ARIA genannt (Ho et al. 1995; Yang et al. 1998). Alle NRG-1 Isoformen binden mit hoher Affinität an den ErbB3 und ErbB4 Rezeptor; ErbB2 bindet NRG-1 nur im Heteromer. Aufgrund ihres strukturellen Aufbaus und ihrer Expressionsmuster wurden die verschiedenen NRG-1 Isoformen in drei Hauptgruppen unterteilt (Meyer et al. 1997; Adlkofer und Lai 2000). Die Transkripte, die für Faktoren der drei Hauptgruppen kodieren, werden von unterschiedlichen Promotoren abgelesen.

Die Typ I Isoformen (NDF, Heregulin, ARIA) besitzen eine N-terminal lokalisierte Ig-Domäne, gefolgt von einer Sequenz mit einer potentiellen Glykosylierungsstelle, der EGF-Domäne, einer Transmembran-Domäne sowie einer in ihrer Länge variablen zytoplasmatischen Domäne (Peles et al. 1993; Holmes et al. 1993; Falls et

al. 1993). Es wird angenommen, daß das Fehlen eines N-terminalen Signalpeptids durch ein internes Signalpeptid ausgeglichen wird, das die Typ I Isoformen an die Zelloberfläche befördert und dort ihre proteolytische Freisetzung ermöglicht. Ein ähnlicher Sezernierungsmechanismus wurde für EGF beobachtet, bei dem eine interne hydrophobe Sequenz im EGF-Protein als Signalpeptid wirkt (Massague und Pandiella 1993). Während der frühen Embryonalentwicklung (ab E6,5) wird Typ I NRG-1 als erste Isoform in einem sehr dynamischen Muster exprimiert. In frühen Stadien findet sich eine breite Expression im Mesoderm, die sich in späteren Stadien auf wenige mesodermale Zellen wie Endokard (Endothel des Herzens) oder Mesenchym lateral der dorsalen Aorta beschränkt (Corfas et al. 1995; Gassmann und Lemke 1997; Britsch et al. 1998). In späteren Stadien wird die Typ I Isoform zusätzlich im Nervensystem exprimiert.

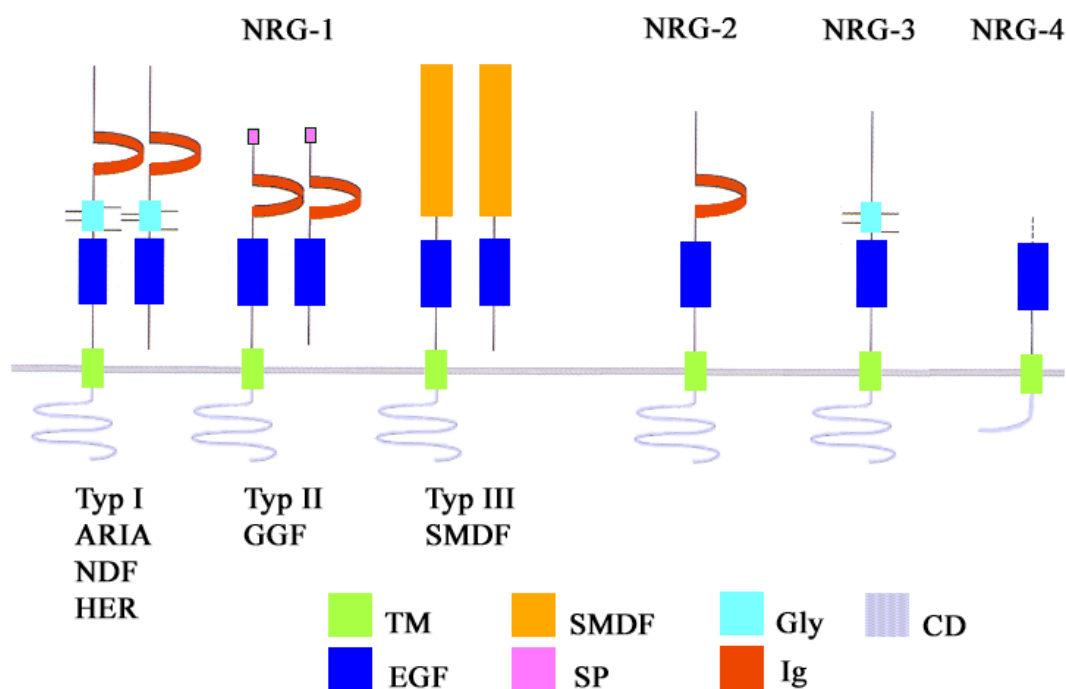


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Neuregulin-Gene.

Das NRG-1 Gen kodiert für über 15 Isoformen, die durch die Verwendung unterschiedlicher Promotoren und durch alternatives Spleißen entstehen. Die drei Hauptgruppen (Typ I-III) des NRG-1 Gens, die sowohl membrangebundene als auch sekretierte Isoformen aufweisen, sind gezeigt. Die Abkürzungen kennzeichnen die Signalpeptide (Sp, Typ II), die Immunglobulin- (Ig), die EGF-, die Glykosylierungs- (Gly), die SMDF- (sensory- and motoneuron derived factor), die Transmembran- (TM) und die

Zytoplasmatische- (CD) Domäne. Die neu identifizierten Neuregulin-Gene (NRG-2 bis 4) sind ebenfalls gezeigt (modifiziert nach Adlkofer und Lai 2000).

Das charakteristische strukturelle Merkmal der Typ II Isoformen (GGF) ist eine N-terminal lokalisierte Signalsequenz gefolgt von einer Sequenz, die entfernte Homologie zu Kringel-Domänen zeigt. Zusätzlich enthält diese Isoform eine Ig- und eine EGF-Domäne. Im Vergleich zu Typ I Isoformen fehlen bei Typ II die Glykosylierungsstellen. Während der Embryonalentwicklung ist die Expression von Typ II im Nervensystem nachweisbar. Typ III NRG-1 (SMDF) enthält die EGF-Domäne, die hydrophobe und zytoplasmatische Domäne, weist aber in den C-terminalen Regionen keine Homologie zu den anderen Isoformen auf. Eine starke Expression dieser Isoform erfolgt während aller Entwicklungsstadien in Motoneuronen und in sensorischen Neuronen. Zusätzlich wird Typ III auch im Gehirn exprimiert.

In den letzten Jahren wurden zusätzlich andere Neuregulin Gene identifiziert (NRG-2-4), die aufgrund der Sequenzhomologie zu NRG-1 kloniert wurden. NRG-2 wurde aus einer genomischen DNA-Bibliothek isoliert (Carraway et al. 1997; Chang et al. 1997). Die Domänenorganisation von NRG-2 und Typ I NRG-1 sind ähnlich. Allerdings besitzt NRG-2 zusätzlich eine N-terminal gelegene Signalsequenz. Abgesehen von dieser vergleichbaren Organisation der Domänenstruktur zeigen beide Proteine nur eine 35%ige Identität in ihrer Aminosäuresequenz (Carraway et al. 1997). NRG-2 wird im Nervensystem und in inneren Organen exprimiert (Chang et al. 1997). NRG-2 bindet direkt an die ErbB3 und ErbB4 Rezeptoren, welche mit ErbB2 heteromerisieren.

Das dritte Neuregulin-Gen, NRG-3, wurde aufgrund der Homologie zu NRG-1 in der „expressed sequence tag“ (ETS) Datenbank identifiziert (Zhang et al. 1998). Im Vergleich zu Typ I NRG-1 fehlt die Ig-Domäne, die durch eine Alanin/Glycinreiche N-terminale Sequenz ersetzt wurde. Die EGF-Domänen des NRG-3 und NRG-1 zeigen eine 31%ige Identität in der Aminosäuresequenz, und die EGF-Domänen von NRG-3 und NRG-2 eine 39%ige Übereinstimmung. Die sechs Cystein-Reste,

die für die Faltung der EGF-Domäne wichtig sind, sind 100%ig konserviert. Die Sequenz anderer Domänen divergiert stärker. NRG-3 besitzt eine interne Signalsequenz, die für dessen Translokation durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulums verantwortlich sein soll. Durch Northern Blot und in situ Hybridisierung wurde die Expression von NRG-3 in verschiedenen Regionen des Nervensystems nachgewiesen (Zhang et al. 1998). NRG-3 bindet an den ErbB3 und ErbB4 Rezeptor. Die Bindung an ErbB2 erfolgt indirekt über Heteromerisierung mit ErbB3 und ErbB4.

NRG-4 wurde als viertes Neuregulin-Gen ebenfalls in den EST Datenbanken identifiziert (Harari et al. 1999). NRG-4 und NRG-1 zeigen 32%ige Identität in der Sequenz der EGF-Domäne. Außer der EGF-Domäne besitzt NRG-4 eine Transmembran-Domäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne. Northern Blot Analysen zeigten eine moderate Expression von NRG-4 in Skelettmuskeln und eine starke Expression im Pankreas. NRG-4 bindet direkt nur an den ErbB4 Rezeptor.

1.3 Signaltransduktion durch Neureguline und ErbB Rezeptoren

Die Signaltransduktion der ErbB Rezeptoren ist sehr komplex. Dies wird bewirkt durch die Heteromerisierung und die Verknüpfung von ErbB Signalwegen mit den Signalwegen anderer Rezeptoren, die synergetische oder antagonistische Wirkung besitzen. Die Liganden von ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen können in vier Gruppen unterteilt werden: (a) an ErbB1 bindende Liganden (EGF, TGF- α und Amphiregulin); (b) Liganden, die an ErbB3 und ErbB4 binden (NRG 1-3); (c) Liganden, die ausschließlich an ErbB4 binden (NRG-4); (d) Liganden, die sowohl an ErbB1 als auch an ErbB4 binden (Betacellulin, Epiregulin und HB-EGF). Es sollte darauf hingewiesen werden, daß unterschiedliche Liganden oder Isoformen, die unterschiedliche EGF-ähnliche Domänen besitzen, die Rezeptoren mit verschiedenen Affinitäten binden.

Zusätzlich zu ihrer Ligandenspezifität unterscheiden sich die ErbB Rezeptoren in der Internalisierung nach der Ligandenbindung, in ihrer Kinaseaktivität und Substratspezifität. Während ErbB1 und ErbB4 typische Rezeptor-Tyrosinkinasen sind, zeigen ErbB2 und ErbB3 Eigenschaften, die für solche Rezeptoren ungewöhnlich sind. Weil vier ansonsten hoch konservierte Aminosäuren in der Kinasedomäne von ErbB3 verändert sind, besitzt ErbB3 keine oder nur sehr geringe Kinaseaktivität (Sliwkowski et al. 1994). Im Gegensatz dazu besitzt ErbB2 Kinaseaktivität, aber es wurde bisher kein Ligand gefunden, der direkt an diesen Rezeptor bindet.

ErbB3 und ErbB2 können trotz dieser ungewöhnlichen Eigenschaften zusammen signalisieren, und zwar durch die Bildung von Heteromeren. In den Heteromeren übernimmt der ErbB3 Rezeptor die Funktion der Ligandenbindung, während ErbB2 die Kinaseaktivität beiträgt. Somit ermöglicht die Heteromerisierung die indirekte Bindung von NRG an ErbB2. Durch Transphosphorylierung von ErbB3, die durch die ErbB2-Kinase erreicht wird, kann ErbB3 aktiviert werden, und an die Tyrosinphosphat-Reste von ErbB3 können Signalübertragungsmoleküle binden.

Heteromerisierung wird nicht nur zwischen ErbB2 und ErbB3, sondern auch zwischen anderen ErbB Rezeptoren beobachtet. Die Heteromerisierung verläuft hierarchisch, wobei ErbB2 als der bevorzugte Korezeptor für alle ErbB Rezeptoren dient (Tzahar et al. 1996; Graus Porta et al. 1997). Im Allgemeinen sind ErbB2 Heteromere biologisch aktiver, werden langsamer internalisiert und zeigen höhere Affinität zu ihren Liganden als andere Rezeptorkombinationen (Beerli et al. 1995; Graus Porta et al. 1995). Die Signaleigenschaften der Rezeptoren können somit durch den spezifischen Liganden und durch den Rezeptorpartner moduliert werden. Im ErbB1/ErbB2 Heteromer zeigt ErbB2 ein anderes Muster der Tyrosin-Phosphorylierung und bindet andere Effektorproteine als im ErbB2/ErbB4 Heteromer. ErbB2/ErbB3 und ErbB2/ErbB4 binden NRG-1 β mit einer höheren Affinität als NRG-1 α (Tzahar et al. 1994; Pinkas Kramarski et al. 1998). Der höher-

affine Ligand induziert eine intensivere und länger andauernde Aktivität der mitogen activated protein kinase (MAPK) sowie eine stärkere Zellproliferation.

Für die Liganden-induzierte Heteromerisierung der ErbB Rezeptoren wurden zwei Modelle postuliert (Burden und Yarden 1997). Das Modell von M. Sliwkowski geht davon aus, daß die Bindung von Neuregulin an den ersten Rezeptor eine Konformationsänderung induziert, die eine Dimerisierungsstelle zugänglich macht, wodurch NRG an den zweiten Rezeptor gebunden werden kann. Im Modell von Y. Yarden werden die Neureguline als bivalente Liganden betrachtet. Dabei erfolgt die Dimerisierung durch die Bindung der N-terminal lokalisierten hochaffinen Stelle des NRGs an den ersten Rezeptor (ErbB3 oder ErbB4). Der zweite Rezeptor bindet dann die C-terminal lokalisierte Stelle, die eine geringere Affinität und breitere Rezeptor-Spezifität aufweist. Auf der Grundlage biochemischer Daten wurde vorgeschlagen, daß dieser Rezeptor-Ligand-Komplex als Tetramer aus zwei Rezeptoren und zwei Liganden besteht (Lemmon et al. 1997).

Die Bindung von Neuregulinen an ErbB Rezeptoren führt zur Aktivierung ihrer Tyrosinkinase und zur Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste der Rezeptoren. An den phosphorylierten Tyrosinresten binden Signalübertragungsmoleküle, die über eine SH2 oder PBD Domäne (src-homology-2 oder phosphotyrosine-binding-domain) verfügen (Pawson und Gish 1992; Bork und Margolis 1995; Kavanaugh et al. 1995). Der phosphorylierte Tyrosinrest und seine flankierenden Sequenzen bestimmen dabei, welche Proteine binden. Einige dieser Proteine sind selbst Enzyme (PI3K), die dann phosphoryliert und aktiviert werden. Andere besitzen keine eigene enzymatische Aktivität (z.B. Adaptoren wie Shc, Grb2). Sie können aber nachgeschaltete Proteine der Signalkaskaden binden. Die Aktivierung der nachgeschalteten Proteine kann entweder durch Phosphorylierung oder durch ihre Translokation vom Zytoplasma an den Rezeptor erfolgen, die sie in Kontakt mit Membranproteinen (z.B. Ras) bringt.

Wichtige Signalübertragungsmoleküle, die durch ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen, aktiviert werden, sind MAP-Kinasen. Sie kontrollieren Zellproliferation, Differenzierung, Zellmigration und das Überleben von Zellen. In Säugetieren besteht dieser Signalweg aus zwölf MAP-Kinasen, sieben MKK (mitogen activated protein kinase kinase) und vierzehn MKKK (mitogen activated protein kinase kinase kinase). Der MAPK Signalweg wird durch verschiedene Signale wie etwa Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine aktiviert. Die Spezifität des jeweiligen Signals wird dabei durch die differentielle Aktivierung unterschiedlicher MKKK-MKK-MAPK Module gewährleistet.

Phosphorylierte Tyrosinreste von ErbB Rezeptoren dienen als Bindungsstelle für p85 (die regulatorische Untereinheit von PI3K) oder für die Ras-Adaptor-Proteine Shc und Grb2 (Carraway et al. 1994). Die Einbeziehung von PI3K und Ras durch aktivierte ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen führt schließlich zur Aktivierung von Raf, MEK- (MKK) sowie MAP-Kinasen. Eines der Module, über die ErbB Rezeptor Signale weitergegeben werden, ist aus dem MP1 (MEK Partner 1) Proteingerüst aufgebaut, an dem MEK 1 (MKK) und ERK 1 (MAPK) binden (Schaeffer, H. J. et al. 1998). Im Zellkern werden bestimmte Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung mit MAPK aktiviert, die in Anhängigkeit zum Eingangssignal die Transkription von bestimmten Genen einleiten.

1.3.1 „Crosstalk“ zwischen ErbB Rezeptoren und anderen Signalwegen

Signalübertragungs-Netzwerke beeinflussen sich gegenseitig. Neueste Untersuchungen zeigen, daß die ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen auch mit heterologen Signalwegen (GPCR, BMP/TGF β , gp130, STAT) interagieren. Unter Verwendung von NIH3T3 Zelllinien, die ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen einzeln oder paarweise exprimieren, wurde gezeigt, daß ErbB1 oder ErbB2/ErbB4 Heteromere über die Src Tyrosinkinase eine Phosphorylierung von STAT Molekülen (signaltransducer and activators of transcription) induzieren (Olayioye et al. 1999). Dadurch werden STAT Moleküle aktiviert, die nach Translokation in den Zellkern die Transkription von Genen regulieren.

IL-6 mit seinem Rezeptor ist ein weiteres Beispiel für einen Signalübertragungsweg, der mit ErbB Rezeptoren interagiert. IL-6 ist ein Zytokin, das bei der Immunabwehr und der Tumorentstehung eine Rolle spielt (Hirano et al. 1997; Okamoto et al. 1997). Behandlung von Prostata-Tumorzellen (LNCaP, DU145, CWR22) mit IL-6 induziert Phosphorylierung von ErbB2 und ErbB3 und eine Assoziation der ErbB Rezeptoren mit der gp130 Untereinheit des IL-6 Rezeptors (Qiu et al. 1998). Die Bindung von IL-6 an seine Rezeptoren kann damit die Liganden-unabhängige Phosphorylierung von ErbB2 und ErbB3 induzieren.

Transaktivierung von ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen (ErbB1 und ErbB2) durch GPCR (G-Protein-coupled receptors) wurde ebenfalls beschrieben (Daub et al. 1996). GPCR besitzen sieben transmembrane Domänen, die nach ihrer Aktivierung zur $G\alpha$ GTP und $G\gamma$ Untereinheit dissoziieren. Die Aktivierung von Effektor-Proteinen wird durch die $G\alpha$ GTP Untereinheit reguliert. Die Zugabe von Endothelin-1, lysophosphatischer Säure (lysophosphatidic acid) und Thrombin zu RAT-1 Fibroblastenzellen führte zur Aktivierung von GPCR und zur Liganden-unabhängigen Aktivierung von ErbB1 und ErbB2 (Daub et al. 1996). GPCR-Aktivierung kann damit ebenfalls die Aktivität von Rezeptor-Tyrosinkinasen modulieren und somit zu einer Erhöhung der Signalvielfalt führen.

1.4 Biologische Funktionen des ErbB2 Rezeptors

Untersuchungen in vivo und in vitro zeigen, daß der ErbB2 Rezeptor Funktionen in der Morphogenese des Herzens, der Entwicklung von Neuralleistenzellen und Schwann'schen Zellen und der Bildung von neuromuskulären Synapsen ausübt. Viele dieser Funktionen wurden in Mäusen, die Null-Mutationen in den Genen tragen, identifiziert (Lee et al. 1995; Meyer und Birchmeier 1995; Erickson et al. 1997; Riethmacher et al. 1997).

1.4.1 Die Funktion von ErbB2 in der Herzentwicklung

Embryonen, die homozygote Mutationen in ErbB2, ErbB4 oder NRG-1 tragen, sterben wegen eines Entwicklungsdefektes im Herzen am Tag 10.5 der

Embryonalentwicklung (E10.5). Histologische Untersuchungen an den mutanten Embryonen zeigten, daß Kardiomyozyten keine Trabekel bilden. Die durch die Ausstülpung des Myokards gebildeten Trabekel verstärken das Herz und ermöglichen so eine effiziente Pumpfunktion. Diese ist nötig für die Blutversorgung der Embryonen, die in dieser Entwicklungsphase zu groß werden, um allein durch Diffusion versorgt zu werden. In der Abwesenheit von Trabekeln werden die embryonalen Zellen also unterversorgt und erhalten die benötigten Nährstoffe und Sauerstoff nicht. Am E9 der embryonalen Entwicklung erfolgt die Expression von NRG-1 im endothelialen Endokard, welches das Myokard von innen auskleidet. Die Bindung von membrangebundenem oder sezerniertem NRG-1 an ErbB2/ErbB4 Heterodimere ermöglicht im Myokard die Aktivierung der Signalkaskaden, die die Bildung der Trabekel am E10,5 einleiten. Der Defekt in der Trabekelbildung beruht also letztendlich auf dem gestörten Signalaustausch zwischen Endokard und Myokard.

1.4.2 Neuralleistenzellen und das periphere Nervensystem

Neuralleistenzellen werden aus dem sich schließenden Neuralrohr gebildet. Sie verlassen den epithelialen Zellverband und wandern entlang zeitlich und örtlich definierter Bahnen über große Distanzen im Embryo zu bestimmten Zielorten. Dort differenzieren sie sich und bilden den größten Anteil des peripheren Nervensystems, aber auch Melanozyten, Kopfmesenchym und einen Teil des Herzens (LeDouarin, 1982; Bronner Fraser 1993). Etwa am E8,25 beginnen die Neuralleistenzellen des Rumpfes medial, zwischen den Somiten und durch den rostralen Teil des Sklerotoms zu wandern. Aus diesen Zellen gehen Spinalganglien, sympathische Ganglien und die Schwann'schen Zellen der Spinalnerven hervor; sakrale Anteile tragen auch zum enterischen Nervensystem bei. Die lateral zwischen Dermatome und Oberflächenektoderm wandernden Neuralleistenzellen bilden die Melanozyten der Haut.

Im Bereich des Kopfes bilden sich zwei Populationen von Neuralleistenzellen mit

unterschiedlichen Differenzierungspotentialen (Noakes et al. 1988). Die Zellen, die als erstes (E8,25) aus definierten Segmenten (Rhombomeren) des Rauten- und Mittelhirns wandern, tragen zum Kopfmesenchym bei. Die zum späteren Zeitpunkt (E9,25) wandernde Population differenziert sich zu Neuronen und Gliazellen der sensorischen Kopfganglien. Zellen, die aus dem posterioren Teil des Rautenhirns stammen, entwickeln sich zu parasymphatischen Ganglien im Magen-Darm-Kanal. Wie im Rumpf wandern auch im Kopf unterhalb der Epidermis Neuralleistenzellen, die Melanozyten bilden.

Verschiedene Gene, die die Wanderung und Differenzierung von Neuralleistenzellen kontrollieren, wurden in den letzten Jahren intensiv erforscht. Dabei hat sich gezeigt, daß verschiedene Tyrosinkinase-Rezeptoren eine wichtige Funktion in der Entwicklung von Neuralleistenzellen übernehmen. Die c-Kit Rezeptor-Tyrosinkinase und ihr Ligand, steel (auch Stem Cell Factor, SCF) genannt, spielen eine entscheidende Rolle bei der Wanderung von Melanozyten. In steel Mutanten ist die Wanderung und das Überleben der Melanozytenvorläufer, die durch Expression von c-Kit identifizierbar sind, beeinträchtigt (Wehrle Haller und Weston 1995). Die sekretierte Form des steel Faktors wird während der anfänglichen Wanderung von Melanozytenvorläufern benötigt, wobei die membrangebundene Form das Überleben der Zellen ermöglicht. Kraniale Neuralleistenzellen, die das enterische Nervensystem bilden, exprimieren die c-Ret Rezeptor-Tyrosinkinase (Pachnis et al. 1993; Durbec et al. 1996). Der Ligand von c-Ret, GDNF, wird im Mesenchym des Darmes exprimiert (Treanor et al. 1996). Sowohl in c-Ret als auch in GDNF mutanten Mäusen fehlen im Mittel- und Hinterdarm enterische Ganglien. Bei Patienten mit heterozygoter Mutation von c-Ret wird ein ähnlicher Defekt beobachtet (Hirschsprung'sche Krankheit) (Edery et al. 1997).

Wandernde Neuralleistenzellen exprimieren ErbB3 und ErbB2, während der Ligand, NRG-1, von Zellen entlang des Wanderungsweges oder am Ziel produziert wird. In NRG-1, ErbB2 oder ErbB3 Mutanten wird schon früh (E10.5) eine ausgeprägte Reduktion der Anzahl der Vorläufer von Schwann'schen Zellen

beobachtet, die sich aus Neuralleistenzellen entwickeln (Meyer und Birchmeier 1995; Erickson et al. 1997; Riethmacher et al. 1997; Britsch et al. 1998). Diese Zellen sind mit den peripheren Axonen assoziiert. NRG-1, das von sensorischen und motorischen Neuronen produziert wird, ermöglicht die Entwicklung der Vorläufer von Schwann'schen Zellen, die ErbB2 und ErbB3 exprimieren.

Weiterhin ist das NRG-1 Signalübertragungssystem für die Wanderung von sympathogenen Neuralleistenzellen notwendig. Diese Neuralleistenzellen wandern zum Mesenchym, das lateral der dorsalen Aorta gelegen ist, wo sie sympathische Ganglien bilden (Britsch et al. 1998). In Mäusen, die eine Null-Mutation für NRG-1, ErbB2 und ErbB3 tragen, wandern die Neuralleistenzellen nicht an diesen Zielort, und die Entwicklung der primären sympathischen Ganglien-Kette ist deswegen stark beeinträchtigt. NRG-1 Typ I wird im dorsalen Neuralrohr, aus dem die Neuralleistenzellen emigrieren, entlang der Wanderungswege und am Zielort der sympathogenen Neuralleistenzellen exprimiert.

Weiterhin wurde bei diesen Mutanten eine Fehlentwicklung der sensorischen Kopfganglien beobachtet (Lee et al. 1995; Meyer und Birchmeier 1995; Erickson et al. 1997). Sensorische Kopfganglien bilden sich aus Zellen der Plakoden und der Neuralleisten. Am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung fehlte in NRG-1, ErbB2 und ErbB3 mutanten Embryonen der Anteil der Kranialganglien, der von den Neuralleistenzellen stammt. Diese Neuralleistenzellen, die ebenfalls ErbB3 und ErbB2 Rezeptoren exprimieren, erhalten ein NRG-1 Signal vom Kopfmesenchym, das essentiell für ihre Entwicklung ist.

1.5 Schwann'sche Zellen und die Schutzhüllen der peripheren Nerven

Neuralleistenzellen bilden Schwann'sche Zellen, die entlang der Axone von sensorischen und motorischen Neuronen lokalisiert sind (Jessen et al. 1994; Jessen and Mirsky 1997). Die Differenzierung zu myelinisierenden und nicht-myelinisierenden Schwann'schen Zellen erfolgt während der postnatalen Entwicklung, wenn auch eine 1:1 Beziehung zwischen myelinisierenden Schwann'schen Zellen und den peripheren Axonen hergestellt wird. Für die Entwicklung dieser Gliazellen ist NRG-1, das von Neuronen produziert wird, essentiell. Der Faktor wird durch die ErbB2 und ErbB3 Rezeptoren erkannt, die während der gesamten Entwicklung der Schwann'schen Zellen exprimiert werden (Jin et al. 1993; Shah et al. 1994; Meyer und Birchmeier 1995; Corfas 1995; Carraway et al. 1997; Britsch et al. 1998). Während der frühen Entwicklung ist NRG für die Proliferation und das Überleben von Schwann'schen Zellen essentiell. Später ist der Faktor für die korrekte Myelinisierung der peripheren Axone wichtig.

Schwann'sche Zellen bilden die Schutzhülle und Myelinscheide von peripheren Axonen. Die Faserbündel der peripheren Nerven werden zusätzlich durch eine Bindegewebshülle vor schädigenden inneren und äußeren Faktoren geschützt. Diese hochorganisierte Bindegewebshülle gliedert sich in das Epineurium, Perineurium und Endoneurium. Durch das Perineurium werden Gruppen von Axonen als eine Einheit umhüllt, wobei das Epineurium alle Axonbündel von außen umschließt. Innerhalb des Perineuriums liegende Axone werden durch das Endoneurium voneinander abgegrenzt. Neue Untersuchungen zeigen, daß Schwann'sche Zellen eine induzierende Funktion bei der Bildung der Schutzhülle der peripheren Nerven haben (Parmentier et al. 1999). Vorläufer der Schwann'schen Zellen exprimieren Dhh (Desert hedgehog), wobei dessen Rezeptor, Patched (ptc), in den frühen Bindegewebszellen ab E13.5 exprimiert wird (Marigo et al. 1996). Ptc ist mit Smoothened (Smo) in der Membran assoziiert. Durch die Bindung von Dhh an Ptc wird Smo aus dem Komplex freigesetzt, und es erfolgt die Aktivierung von

nachgeschalteten Signalkaskaden. Dieses Signal ist essentiell für die Entwicklung der Nervenhüllen.

Neureguline sind nicht nur während der frühen Entwicklung von Schwann'schen Zellen wichtig. Dies wurde durch eine konditionelle Mutation von ErbB2 in Schwann'schen Zellen gezeigt, die durch Cre-Rekombinase induziert wurde (Garratt et al. 2000). Dazu wurde ein Krox20-cre Allel eingesetzt, das in der perinatalen Phase in myelinisierenden Schwann'schen Zellen exprimiert wird. Mutante Tiere mit dem Genotyp Krox20-Cre/+; ErbB2^{flox}/– zeigen eine 2-3fache Reduktion der Schichtdicke der Myelinscheide und entwickeln Symptome einer peripheren Neuropathie.

1.6 Motoneuronen und neuromuskuläre Synapsen

1.6.1 Motoneuronen des Rückenmarks

Motoneuronen entstehen im ventralen Neuralrohr. Das induktive Signal, das für die Determinierung der Motoneuronen notwendig ist, wird durch sonic hedgehog (shh) vermittelt, das von der Chorda dorsalis und später von der Bodenplatte produziert wird (Ericson et al. 1996). Aus der primären Motorsäule wandern Motoneuronen zu ihren endgültigen Positionen im Rückenmark. Somit entstehen die mediale, mediolaterale und laterale Motorsäule. Es existiert eine Korrelation zwischen der anatomischen Lokalisation, der kombinatorischen Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren und dem Innervationsgebiet der Motoneuronen. Auf dieser Grundlage wurde eine detaillierte molekulare Klassifizierung von Motoneuronen vollzogen (Tsuchida et al. 1994).

Motoneuronen im medialsten Anteil der medialen Motorsäule (medial division of the medial motor column = MMC_m) innervieren die dorsalen Axialmuskeln und exprimieren ISL-1, ISL-2 und Lim-3. Die Innervation der ventralen Rumpfmuskeln erfolgt durch die ISL-1 und ISL-2 exprimierenden Motoneuronen im lateralen

Anteil der medialen Motorsäule (lateral division of the medial motor column = MMC_l). Die im lateralen Anteil der lateralen Motorsäule (lateral division of the lateral motor column = LMC_l) lokalisierten Motoneuronen exprimieren ISL-2 und Lim-1. Sie innervieren die dorsalen Muskeln der Extremitäten. Die ventralen Muskeln der Extremitäten werden durch ISL-1 und ISL-2 positive Motoneuronen innerviert, die in dem medialen Anteil der lateralen Motorsäule (medial division of the lateral motor column = LMC_m) vorkommen. Die in der Terni-Motorsäule (column of terni = CT) organisierten viszerale Motoneuronen, die über präganglionäre Neuronen die glatten Muskeln innervieren, exprimieren ISL-1.

1.6.2 Motoneuronen und periphere Synapsen

An der neuromuskulären Synapse kontaktiert der Nerv den Muskel und übermittelt Signale. Neuromuskuläre Synapsen bestehen aus den präsynaptischen Nervenendigungen, aus postsynaptisch spezialisierten Regionen der Muskelfasern und aus terminalen Schwann'schen Zellen. Nach dem ersten Kontakt zwischen Axon und Muskel bildet der Wachstumskegel des Axons eine präsynaptische Nervenendigung. Diese Differenzierung beinhaltet unter anderem eine Akkumulation von synaptischen Vesikeln, Mitochondrien, Acetylcholin-Transferase und vesikulärem Acetylcholin-Transporter. Postsynaptisch, in der Muskelfaser, erfolgt ebenfalls eine Spezialisierung. Dabei werden zuerst bestimmte Proteine, z.B. Acetylcholin-Rezeptoren in der Synapsenregion aggregiert. Während der Reifung der Synapse erfolgt eine spezifische Expression von Genen in den Muskelzellkernen, die in der unmittelbaren Nähe der Synapse lokalisiert sind (postsynaptische Kerne). Moleküle, die aus der Nervenendigung stammen, induzieren Aggregation und postsynapsenspezifische Expression der Acetylcholin-Rezeptoren. Agrin, das vom Nerven gebildet wird, induziert die Aggregation der Acetylcholin-Rezeptoren, wobei postsynaptisch die Tyrosinkinase Musk und zytoplasmatisches Rapsyn essentiell für den Aggregationsprozeß sind (Burden 1998; Sanes et al. 1998). Durch den Aggregationsprozeß wird eine stark erhöhte

Konzentration von Acetylcholin-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran erreicht, d.h. eine Dichte von $10000/\mu\text{m}^2$.

Gene die für die Untereinheiten der Acetylcholin-Rezeptoren (AChR)- (α_2 , β , δ , γ), für Acetylcholin-Esterase (AChE) oder für die regulatorische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase (pKA) kodieren, werden vor der Innervation von allen Muskelzellkernen exprimiert. Die elektrische Aktivität der innervierten Muskelfaser ist verantwortlich dafür, daß in extrasynaptischen Muskelzellkernen die Expression von Acetylcholin-Rezeptoren reprimiert wird. Durch Acetylcholin, den Transmitter, werden die AChR-Kanäle geöffnet, Na^+ -Ionen strömen ein, und ein Aktionspotential wird gebildet. Dadurch wird die gesamte Muskelfaser depolarisiert und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht (Huang et al. 1994). Ca^{2+} aktiviert die Proteinkinase C, die die bHLH-Transkriptionsfaktoren phosphoryliert. Die Phosphorylierung verhindert die Bindung der Transkriptionsfaktoren an E-Box Sequenzen, wichtigen Motiven in den Promotoren der Gene, die für die Untereinheiten der Acetylcholin-Rezeptoren kodieren (Klarsfeld et al. 1989; Hall und Sanes 1993). Diese Gene werden nicht nur extrasynaptisch reprimiert, sondern auch postsynaptisch hochreguliert. Tyrosinkinasen können die Expression solcher postsynaptisch regulierten Gene stimulieren.

Der Effekt von ErbB Rezeptoren auf die Expression von Acetylcholin-Rezeptoren in Muskelzellen wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht. Untersuchungen an kultivierten Myotuben zeigen, daß der Einsatz von dominant negativem Ras oder Raf sowie die Inhibierung von Erk 1 und Erk 2 MAPK zur Verhinderung der durch Neuregulin induzierten AChR Genexpression führen (Si und Mei 1999; Si et al. 1999). Aktiviertes Ras oder Raf induziert hingegen die Expression der Gene, die zur erhöhten Akkumulation der AChR Untereinheit führen. Die ETS Transkriptionsfaktoren GABP α und GABP β , die an die N-Box (Ets-Bindungsdomäne) Promotorregion der AChR Gene binden, sollen bei der postsynaptischen AChR Genexpression eine entscheidende Rolle spielen. Der Transkriptionsfaktor GABP α

wird bevorzugt in postsynaptischen Regionen exprimiert. Zusätzlich zu der transkriptionellen Regulation von GABP kann auch der Neuregulin/ErbB Signalweg die Phosphorylierung der beiden Transkriptions-faktoren über MAPK regulieren (Schaeffer, L. et al. 1998).

In Zellkultur wurde gezeigt, daß Neuregulin-1 die Expression von Genen, die für Untereinheiten der Acetylcholin-Rezeptoren kodieren, in Muskelzellen stimuliert. In C2 Muskelzellkultur wurde durch Zugabe von rekombinantem Neuregulin (5nM) eine 2,5-fache Erhöhung der δ -Acetylcholin Untereinheit beobachtet (Jo et al. 1995). Trotz ähnlicher intensiver Studien existieren bisher keine in vivo Daten, die die direkte Rolle von NRG und ErbB Rezeptoren in der postsynaptischen AChR Genexpression beweisen.

Neben AChR werden auch andere Proteine, die bei der Synapsenbildung und -erhaltung beteiligt sind, postsynaptisch exprimiert und in synaptischen Muskelmembranen oder der Basallamina akkumuliert. Acetylcholin-Esterase wird, nach der Anheftung eines Kollagen-Schwanzes an ihre katalytische Untereinheit, selektiv in der synaptischen Basallamina lokalisiert (Chiu und Sanes 1984). Utrophin, Dystrophin und die ErbB Rezeptoren (ErbB2, ErbB3, ErbB4) sind in der synaptischen Muskelmembran aggregiert. Auch Neuregulin ist synaptisch aggregiert; dies soll durch Bindung der Ig-Domäne an Proteoglykane in der synaptischen Basallamina erfolgen (Loeb und Fischbach 1995; Sandrock et al. 1997). Vom Muskel produziertes Laminin- β 2, das bei der präsynaptischen Differenzierung eine Rolle spielt, wird auch in die synaptische Basallamina abgegeben.

Die nicht myelinisierenden terminalen Schwann'schen Zellen sind an der Bildung, Regeneration und Modulation von neuromuskulären Synapsen beteiligt. Schwann'sche Zellen produzieren trophische Faktoren, die das Überleben von peripheren sensorischen und motorischen Neuronen ermöglichen (Acheson et al.

1991; Bunge 1994; Riethmacher et al. 1997). Dadurch wird ihre normale Entwicklung und funktionelle Differenzierung möglich. Nach Denervation bilden die terminalen Schwann'schen Zellen Fortsätze. Die regenerierenden Axone können entlang dieser Fortsätze wachsen und neue Synapsen bilden (Son und Thompson 1995). Weiterhin wird die Neurotransmission an neuromuskulären Synapsen durch terminale Schwann'sche Zellen moduliert (Wu und Betz 1996; Robitaille 1998).

1.7 Ziel der Arbeit

Innerhalb der Klasse I der Rezeptor-Tyrosinkinasen spielt ErbB2 eine zentrale Rolle als Korezeptor. Seine besondere Eigenschaft als Heteromerisierungspartner aller anderen Rezeptoren dieser Subfamilie ermöglicht die Erhöhung der Signalvielfalt. Weiterhin ist die ErbB2 Rezeptor-Tyrosinkinase in heterologen Signalwegen wie etwa GPCR oder gp130 beteiligt. Amplifikation oder Überexpression von ErbB2 wurde in vielen menschlichen Tumoren beobachtet und korrelierte mit einer negativen Prognose für diese Patienten (Yokota et al. 1986; Zhang et al. 1989; Kameda et al. 1990; Shi et al. 1992; Sauter et al. 1993).

Um die in vivo Funktion von ErbB2 zu untersuchen, wurde dieses Gen in Mäusen mutiert. Dazu wurden homologe Rekombination und die embryonale Stammzell-Technologie eingesetzt. Homozygote Embryonen sterben zwischen Tag 10,5-11 der Embryonalentwicklung wegen eines morphogenetischen Defekts im Herzen (Lee et al. 1995; Erickson et al. 1997). Im Besonderen wurde beobachtet, daß die Trabekelbildung in den Ventrikeln nicht stattfindet. Durch das Fehlen von Trabekeln zeigten die mutanten Embryonen am E 10,5 einen unregelmäßigen Herzschlag und ein vergrößertes Herz. Zusätzlich wurden weitere Defekte in Neuralleistenzellen und ihren Derivaten beobachtet.

Für die Untersuchung späterer Funktionen von ErbB2 in vivo wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit die ErbB2 cDNA herzspezifisch unter der Kontrolle des

Nkx2.5 Promotors exprimiert. Dieses Nkx2.5^{ErbB2}-Allel wurden in einen ErbB2^{-/-} genetischen Hintergrund eingekreuzt. Durch die herzspezifische Expression von ErbB2 konnte das frühe Sterben der ErbB2^{-/-} Embryonen verhindert und eine normale Herzentwicklung der Tiere erreicht werden. Dadurch wurde es möglich, andere, spätere Konsequenzen der Mutation zu untersuchen. Der Phänotyp dieser Tiere wurde mit dem Phänotyp von ErbB3^{-/-} Tieren verglichen. ErbB2^{-/-} Embryonen, die ErbB2 cDNA nur im Herzen exprimieren (gerettete ErbB2^{-/-} Embryonen), wurden lebend geboren und starben einige Minuten später wegen einer Atmungsunfähigkeit, die durch gravierende Defekte des Nervus phrenicus verursacht wurde. Die weitgehende Ähnlichkeit des Phänotyps mit dem der ErbB3 Mutation zeigt die essentielle Korezeptor-Funktion des ErbB2 Rezeptors auf.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Serumalbumin des Rindes
cDNA	Komplementär-DNA
Ci	Curie
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dd	bidestilliert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbeco's modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DECP	Diethylpropyocarbonat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
ETOH	Ethanol
FA	Formamid
FCS	Fetal Calf Serum
G418	Geneticin
hcG	humanes choriondrotisches Gonadotropin
HEPES	N-(2-Hypoxyethyl) piperazin-N-ethylsulfonsäure
kb	Kilobasenpaare
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
M, mM	molar, millimolar
min	Minuten
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
Neo	Neomycin-Resistenz-Gen
PBS	Phosphatgepuffertes Salin
p.c.	post coitum
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
TK	Thymidinkinase-Gen
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris (hydrocymethy)-amino-methan
U	Unit, Einheit einer Enzymaktivität
ÜN	über Nacht
VM	Vollmedium
V/V	(Volumen/Volumen) Volumenprozent
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D-galactosid

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Die meisten der verwendeten Enzyme und Chemikalien stammen von folgenden Firmen: Amersham Buchler, Braunschweig; Biochrom, Berlin; Boehringer GmbH, Mannheim; Gibco/BRL, Eggenstein; Merck, Darmstadt; New England Biolabs GmbH (NEB) Schwalbach; Roth AG, Karlsruhe; Serva Feinbiochemie, München; Sigmachemie, München; USB, Bad Homburg.

2.1.3 Verwendete Wirts- und Vektorsysteme

Bakterienstämme:

C 600	supE 44, hsdR, thi-1, thr-1, Leu B 6, LacY 1, ton A21
C 600hflA	supE 44, hsdR, thi-1, thr-1, Leu B 6, LacY 1, ton A21, hflA 150 (chr: Tn10, tet ^r)
XL 1 blue	supE 44, hsdR 17, rec A1, end A1, gyr A 46, thi-1, rel A1, Lac [F': pro AB ⁺ , lacI7, LacZΔM15, Tn10 (tet ^r)]

Vektoren:

pBluescript II +:	Stratagene (Short et al. 1988)
pGEM-I:	Stratagene (zur Klonierung von pcr-Fragmenten)
pTVO	Plasmid mit Neo- und TK-Kassetten
pUC:	Vieira und Messing (1982)

2.1.4 Medien, Standardpuffer und Standardlösungen

1L LB-Flüssigmedium:

10 g Trypton

5g Hefeextrakt

5g NaCl

1L LB-Agarplatten:

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

15 g Agar

1x TE:

10 mM Tris-HCl (pH 7,4)

1 mM EDTA (pH 8,0)

Für TE mit verschiedenen pH-Werten wurde Tris-HCl

des entsprechenden pH eingesetzt.

1L PBS:

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,44 g Na₂HPO₄

0,24 g KH₂PO₄

auf pH 7,4 mit HCl und auf 1 L mit dd H₂O

1 M Tris:

121,1 g Tris „base“ in 800ml H₂O

Die pH wurde wie folgt mit konzentrierter HCl eingestellt:

pH HCl

7,4 70 ml

7,6 60 ml

8,0 42 ml

Diese Lösung wird durch Stehenlassen bei RT zum Kühlen gebracht, mit destilliertem H₂O auf 1L aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

ES-Zell-Medium:

400 ml DMEM Medium (Biochrom oder GIBCO)

200 µl Penizillin/Streptomycin-Lösung

75 ml FCS (30 min bei 56°C inaktiviert)

5 ml nichtessentielle Aminosäuren

5 ml 200 mM L-Glutamin

5 ml 10 mM β-Mercaptoethanol

50 µl LIF

Fibroblasten-Medium:

400 ml DMEM Medium (Biochrom oder GIBCO)

200 µl Penizillin/Streptomycin-Lösung

50 ml FCS (30 min bei 56°C inaktiviert)

5 ml nichtessentielle Aminosäuren

5 ml 200 mM L-Glutamin

5 ml 10 mM β -Mercaptoethanol

ES-Zellen Einfriermedium:

ES-Zell-Medium

10% FCS

10% DMSO

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation von DNA

Die Isolierung hochmolekularer Nukleinsäuren ist einer der ersten und entscheidendsten Schritte gentechnologischer Arbeiten. Die grundlegenden Arbeitsschritte einer Nukleinsäurepräparation sind Zellaufschluß und Lyse, Zentrifugation, Deproteinisierung, Präzipitation und wenn nötig Hochreinigung.

2.2.1.1 Präparation von genomischer DNA

Ausgangsmaterial sind 200 mg bis 1g Gewebe. Dieses Gewebe wird fein zerkleinert mit flüssigem Stickstoff gefroren und mit Mörser und Pistill zu Puder zerrieben.

- Das pulverisierte Gewebe wird mit 1,2 ml Verdauungspuffer/100 mg Ausgangsmaterial suspendiert.
- Man inkubiert die Suspension in fest verschlossenen Gefäßen 12-18 h im Schüttelwasserbad bei 50°C.
- Die nunmehr visköse Suspension wird mit einem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.
- Man zentrifugiert 10 min bei 10000 rpm und nimmt die wässrige Oberphase mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze ab.
- Nach Zugabe von 0,5 Volumen 7,5%igem Ammoniumacetat und 2 Volumen 100%igem Ethanol sollte unmittelbar die DNA ausfallen.
- Die DNA wird mit einer gebogenen Pasturpipette herausgefischt und 2 min bei 500 rpm zentrifugiert, das Pellet mit 70%igem Ethanol überspült und leicht getrocknet.

- Das Pellet wird in TE-Puffer gelöst. (Ausgehend von 200 mg Ausgangsmaterial kann man ca. 400 µg DNA erwarten.)
- Benutzt man kultivierte Zellen zur DNA-Präparation, so werden diese zunächst durch Zentrifugieren (5 min bei 1500 rpm) von dem Kulturmedium getrennt.
- Man resuspendiert die Zellen in 1 bis 10 ml eiskalter PBS, zentrifugiert 5 min bei 1500 rpm und gießt den Überstand ab.
- Nach nochmaligem Resuspendieren in PBS, Zentrifugieren und Abgießen des Überstandes werden die Zellen in 1 Volumen Verdauungspuffer resuspendiert.
- Die weitere Prozedur entspricht den Punkten 3 bis 7.

Verdauungspuffer:

0,1 M NaCl
 0,010 M Tris-HCl pH 8,0
 0,025 M EDTA pH 8,0
 0,5% SDS
 0,1 mg/ml Proteinase K
 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1

2.2.1.2 Mikropräparation von genomischer DNA aus ES-Zellen

- Die Mikropräparation von genomischer DNA nach Ramiro Ramirez-Solis et al. (1992) ermöglicht das Screenen einer größeren Anzahl von ES-Zell-Klonen durch Southern-Hybridisierung.
- Im Gegensatz zu konventionellen DNA-Präparationsmethoden erfolgt die DNA-Isolation ohne Phenol/Chloroform Extraktion.
- Die auf gelatinisierten 96-Loch-Platten dicht gewachsenen ES-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 50 µl Lysis Puffer über Nacht bei 50°C inkubiert.
- Nach Zugabe von 100 µl eiskaltem Ethanol zusammen mit 1,5 µl 5 M NaCl erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei RT.
- Anschließend wurde die für Fällung der DNA eingesetzte Lösung, durch Umkippen weggegossen und die DNA mit 70%igem Ethanol dreimal gewaschen.

- Danach wurde die DNA für etwa 20 min leicht luftgetrocknet und für die Restriktionsverdauung eingesetzt.
- Nach Zugabe von 50 µl Restriktionsmix erfolgte eine Über-Nacht-Verdauung bei 37°C unter leichtem Schütteln.
- Anschließend wurde der Restriktionsansatz durch Zugabe 1/10 Volumen von „Loading-Puffer“ gestoppt. Die Hälfte von diesem Ansatz wurde auf 1%igem Agarosegel aufgetragen und bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt.
- Nach photographischer Dokumentation wurde das Gel für die Southern-Blot-Analyse eingesetzt.

Lysis Puffer

10 mM Tris pH 7,5
 10 mM EDTA
 10 mM NaCl
 0,5% Sarcosyl
 1 mg/ml Proteinase K

Restriktionsmix

1x Restriktionspuffer
 1 mM Spermidine
 100 µg/ml BSA
 50 µg/ml RNase
 10 - 15 U Enzym

2.2.1.3 Minipräparation von Plasmid-DNA (nach Birnboim, 1983)

- Nach einer Kultivierungszeit von 18 h bei 37°C wurden 1,5 ml einer 2 ml Übernachtskultur aus einem Teströhrchen in ein Eppendorfröhrchen pipettiert.
- Das Pellet wurde in 80 µl Puffer I resuspendiert. Nach Zugabe von 160 µl Puffer II und vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz auf Eis gelagert.
- Das Lysat wurde mit 120 µl Puffer III versetzt und 5 min auf Eis inkubiert.
- Anschließend wurden 500 µl Phenol/Chloroform zugegeben, unter starkem Schütteln vermischt und 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert.

- Die DNA-haltige wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorfröhrchen überführt und mit 800 µl 96%igem Ethanol versetzt.
- Die DNA wurde durch 5-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm gesammelt.
- Das Pellet wurde leicht getrocknet und mit 35 µl TE + RNase (100 µg/ml) resuspendiert und 20-30 min bei 37°C inkubiert.

Puffer I

50 mM Glucose
25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
10 mM EDTA (pH 8,0)

Puffer II

0,2 N NaOH
1% SDS

Puffer III

60 ml 5 M Kalium Acetate
11,5 ml Essigsäure
28,5 ml H₂O

2.2.1.4 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Präparation von Plasmid-DNA über QIAGEN Säule

- 500 ml über Nacht hochgezüchtete Bakterienkultur wurde für 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert.
- Das Pellet wurde in 10 ml Puffer P1 resuspendiert, nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 vorsichtig gemischt und für 5 min bei RT inkubiert.
- Nach Zugabe von eiskaltem Puffer P3 erfolgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis.
- Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 16000 rpm (mit dem Rotor JA20) wurde das Pellet auf „QIAGEN-Tip Säule“ überführt, die vorher mit dem Puffer QBT equilibriert war.
- Die mit der DNA-haltigen Lösung beladene Säule wurde zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen.

- DNA Elution erfolgte mit 15 ml Puffer QF, und das Eluat wurde in corex-Röhrchen gesammelt.
- Nach Zugabe 0,7 Volumen Isopropanol wurde die DNA bei 8000 rpm (4°C) für 30 min zentrifugiert.
- Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 500 µl TE-Puffer aufgenommen.

Puffer-Lösungen:

P1: RNase A (100 µg/ml) in 50 mM Tris-HCL

10 mM EDTA, pH 8,0

P2: 200 mM NaOH

1% SDS

P3: 2,55 M Kac, pH 4,8

QB: 750 mM MOPS

750 mM NaCl, pH 7,0

15% Ethanol

QC: 1 M NaCl, pH 7,0

50 mM MOPS

15% Ethanol

QF: 1,2 M NaCl, pH 8,0

50 mM MOPS

15% Ethanol

QBT: QB+0,15% Triton x-100

QA: 400 mM NaCl, pH 7,0

50 mM MOPS

15% Ethanol

Präparation von Plasmid-DNA durch Triton-Lyse (nach Sambrook, 1989)

- Ausgehend von einer Einzelkolonie wurden 300 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert.
- Die Bakterienkultur wurde in Schraubdeckelgefäße überführt und bei 4000 rpm für 15 min in der Beckmann-Zentrifuge J6-B zentrifugiert.

- Das Pellet wurde in 10 ml 50 mM Tris pH 8,0 resuspendiert mit 1 ml Lysozym (20 mg/ml in 50 mM Tris pH 8,0) vermengt und für 10 min auf Eis inkubiert.
- Nach Zugabe von 100 µl RNase (10 mg/ml) und 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden 200 µl Triton beigemischt und für 10 min auf Eis gelagert.
- Anschließend erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 18000 rpm in der Beckmann-Zentrifuge JA21.
- Der Überstand wurde in Falcon-Röhrchen überführt mit gleichem Volumen Phenol versetzt und gut geschüttelt.
- Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 5000 rpm (Rotor JA10) wurde der Überstand mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform versetzt, gut gemischt und erneut für 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert.
- Nach der Wiederholung des 7. Schrittes wurde der Überstand durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Na-Acetat sowie 0,56 Volumen Isopropanol leicht schwenkend gemischt und 10 min bei RT inkubiert.
- Die Pelletierung der ausgefallenen DNA wurde durch Zentrifugation bei 12000 rpm im JA10 Rotor durchgeführt.
- Nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, leicht luftgetrocknet und in ca. 450 µl TE resuspendiert.

2.2.2 Herstellung von kompetenten E. coli Bakterien

2.2.2.1 Herstellung von kompetenten E. coli Bakterien (nach Hanahan, 1985)

- Mit einer Impföse wurde der bei -70°C gefroren gelagerte E. coli Stamm auf eine SOB Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.
- 4 bis 5 gut gewachsene Kolonien (1-2 mm Durchmesser) wurden in 1 ml SOB-Medium (mit 20 mM MgSO₄) aufgenommen und durch Vortexieren durchmischt.
- Anschließend wurden die Zellen in 30-100 ml SOB-Medium (mit 20 mM MgCl₂) überführt und in einer 1L Flasche bei 37°C für 2 bis 3h inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,6 erreichten.

- Danach wurden die Zellen auf Eis für etwa 10 min gelagert und dann bei 4000 rpm für 10 min (4°C) zentrifugiert.
- Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 20 ml eiskaltem FSB-Puffer vorsichtig resuspendiert.
- Die Bakterien wurden 10 min auf Eis gelagert und anschließend für 10 min bei 4000 rpm (4°C) zentrifugiert.
- Das Pellet wurde durch Zugabe von 4 ml FSB-Puffer suspendiert, mit 700 µl DMSO vermengt und nach vorsichtigem Umschwenken für 15 min auf Eis inkubiert.
- Nach nochmaliger Wiederholung des 7. Schrittes wurden die Zellen auf eisgekühlte Eppendorfröhrchen portioniert.
- Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und sofort bei -70°C gelagert.

1L FSB-Puffer (pH 6,4)

10 mM Kalium Acetat, pH 7,5

45 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

100 mM KCl

3 mM Hexamincobalt chloride

10% Glycerol

Diese Puffer-Lösung kann nach dem Filtrieren (0,45 µM Nalgene Filter) bei 4°C gelagert werden.

1L SOB-Medium (pH 6,8 bis 7)

2% (W/V) Bacto Tryptone

0,5% (W/V) Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

20 mM MgCl_2 (kurz vor Gebrauch einsetzen)

2.2.2.2 Herstellung von kompetenten E. coli Bakterien (nach Inoue, 1990)

- Der gewünschte E. coli Stamm wird in 3 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C gezüchtet.
- Von dieser ÜN Kultur entnimmt man 2,5 ml, um ein 250 ml SOB-Medium zu beimpfen, das über Nacht bei 18°C bis Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert wird.
- Nach 10-minütigem Lagern auf Eis wird die Bakterienkultur 10 min bei 3000 rpm (4°C) zentrifugiert.
- Das Pellet wird vorsichtig in 80 ml eiskalter TB-Lösung resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert.
- Nach erneutem, 10-minütigen Zentrifugieren bei 3000 rpm (4°C) wird das Pellet vorsichtig mit 20 ml eiskaltem TB-Medium gelöst.
- Anschließend wird den Zellen DMSO mit einer Endkonzentration von 7% zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert.
- Am Ende werden die Zellen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und so schnell wie möglich bei -70°C aufbewahrt.

1L TB-Lösung (pH 6,7)

10 mM Pipes

55 mM MnCl₂

15 mM CaCl₂

250 mM KCl

1L SOB-Medium (pH 6,7 - 7,0)

2% (W/V) Bacto Tryptone

0,5% (W/V) Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

2.2.3 Präparation von RNA

Die RNA Isolation wurde mit TRIZOL™ - Kit von GIBCO-BRL durchgeführt:

- 1 ml TRIZOL-Lösung wurde in die jeweiligen Eppendorfröhrchen gegeben, die die Embryonal-Gewebe aus der Muskulatur der oberen und unteren Extremitäten, des Zwerchfells, der Leber, des Gehirns und Rückenmarks und des Herzens enthielten.
- Die Gewebe wurden homogenisiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Röhrchen für etwa 15 Sekunden stark geschüttelt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Daran wurde eine 15-minütige Zentrifugation bei 10600 rpm (4°C) angeschlossen und der wässrige Überstand in ein neues Röhrchen überführt.
- Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol und 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 10600 rpm (4°C).
- Das RNA-Pellet wurde nach Zugabe von 1ml 75%igem Ethanol durch Vortexieren durchmischt, für 5 min bei 8400 rpm (4°C) zentrifugiert und leicht luftgetrocknet.
- Anschließend wurde das RNA-Pellet in 0,5% SDS-haltigem DEPC behandelten Wasser aufgelöst und seine Konzentration bestimmt.

2.2.4 Spektralphotometrische Ermittlung der Nukleinsäure-Konzentration

Das Absorptionsspektrum einer Verbindung wird als graphische Darstellung der absorbierten Lichtmenge gegen die Wellenlänge aufgezeichnet. Nukleinsäuren absorbieren aufgrund der Spektralcharakteristika der in ihnen enthaltenen Stickstoffbasen Ultraviolettes Licht zwischen 250 nm und 270 nm mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm. Für die Quantifizierung der DNA- und RNA-Konzentrationen wurden Messungen bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm durchgeführt. Der bei 260 nm gemessene OD-Wert von 1 entspricht einer Konzentration von ca. 50 µg/ml für doppelsträngige DNA, 40 µg/ml für einzelsträngige DNA und RNA und ca. 20 µg/ml für einzelsträngige

Oligonukleotide. Der Quotient aus den bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorptionen gibt Auskunft über den Reinheitsgrad einer Nukleinsäurepräparation, wobei dieser Wert für eine reine DNA- und RNA-Lösung zwischen 1,8 und 2,0 liegt. Ein geringerer Quotientenwert ist ein Hinweis auf Kontamination mit Protein oder Phenol sowie auf unvollständige Auflösung der Nukleinsäure. Die bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessene Extinktion E_{260} der Lösung wurde folgendermaßen umgerechnet:

$$\text{ds DNA} = E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Konzentration in mg/ml}$$

$$\text{RNA} = E_{260} \times 30 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Konzentration in mg/ml}$$

2.2.5 Gelelektrophoretische Verfahren

Durch die elektrophoretischen Trennungsvorgänge wird die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung ausgenutzt. Dafür werden elektrisch neutrale Festgelmatrizen aus Agarose oder PAA eingesetzt. Nukleinsäuren, die wegen ihres Zucker-Phosphat-Rückgrates bei allen pH-Werten negativ geladen sind, wandern während der Elektrophorese zur Anode und zwar um so schneller, je kleiner sie sind. Dabei wird die Wanderung der DNA durch verschiedene Faktoren wie etwa Molekulargewicht, Konformation der DNA, Agarosekonzentration, angelegte Gleichspannung, verwendete Elektrophoresepuffer und das Vorhandensein interkalierender Agenzien (z.B. Ethidiumbromid) beeinflusst. Gele aus Agarose erlauben eine Trennung von Fragmenten mit einer Länge von 70 bp bis zu einer Größe von 50 kb, wohingegen Gele aus PAA eine Trennung von Fragmenten zwischen 10 und 2000 bp ermöglichen. In Abhängigkeit davon, in welchem Molekulargewichtsbereich eine besonders effektive Trennung von DNA gewünscht wird, wählt man die einzusetzende Agarosekonzentration. Zur Auftrennung großer DNA-Moleküle empfiehlt es sich im Allgemeinen, neben einer niedrigen Agarosekonzentration ebenfalls eine niedrige Spannung anzuwenden.

2.2.5.1 DNA-Auftrennung in Agarosegelen

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde die Agarose in dem entsprechenden Volumen 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf etwa 50°C wurde Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,3 µg/ml zugesetzt. Das Gel wurde in einen an den Seiten abgedichteten Gelträger gegossen. Nach Positionierung des Kamms wurde es zum Erstarren gebracht. Danach wurde die Abdichtung entfernt und der Gelträger in eine Gelkammer, die 1x TAE als Laufpuffer enthielt, überführt. Anschließend wurden die DNA-Proben mit 1/10 Volumen 10x Ladepuffer gemischt, in die Taschen des Gels gefüllt und bei 45-90 Volt (~ 4-10 V/cm) elektrophoretisch getrennt. Durch das Fluoreszieren der DNA-Ethidiumbromid-Komplexe unter UV-Licht konnte die Identifizierung und Dokumentierung der DNA-Fragmente erfolgen.

2.2.5.2 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung werden die zu eluierenden Gelabschnitte mittels Skalpell oder Rasierklinge herausgeschnitten. Zur Isolierung der in dem Gelstück befindlichen DNA wurden zwei Methoden angewandt.

Elution von DNA durch Extrusion aus der Gelmatrix

Das ausgeschnittene Gelstück wird zwischen Parafilm bei -20°C kurz eingefroren und anschließend durch Druck zwischen den Fingern ausgepreßt. Ebenso kann das Gelstück im Mikrozentrifugenröhrchen eingefroren und durch Zentrifugation ausgepreßt werden. Die DNA-haltige Flüssigkeit wird durch Zugabe von gleichen Volumen Phenol/Chloroform durchgemischt und 5min zentrifugiert. Anschließend wird zweimal mit Chloroform extrahiert und zentrifugiert.

Die DNA-Fällung erfolgt durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat und 2,5 Volumenteilen 96%igen Ethanols zu dem Überstand und Inkubation bei -20°C für 1h. Das Präzipitat wird durch 10-minütiges Zentrifugieren abgetrennt, zweimal mit 80%igem Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet und anschließend in TE-Puffer

aufgenommen. Die Reinheit und Qualität der so gewonnenen DNA wird gelelektrophoretisch getestet.

Isolierung von DNA mittels Elektroelution

Der Agaroseblock wurde mit 250-350 µl TAE-Laufpuffer in einen Dialyseschlauch überführt, dieser mit Klemmen verschlossen und in TAE-Laufpuffer für etwa 20-30 min elektrophoriert. Nach Umpolen für etwa 30 Sekunden wurde die Pufferlösung entnommen und in ein Eppendorfröhrchen überführt. Nach Zugabe gleichen Volumens Phenol/Chloroform und gutem Durchmischen für 10 min wurde die DNA-haltige Lösung bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in neues Eppendorfröhrchen überführt, zur Fällung der DNA mit 1/10 Volumen 3M Na-Acetat, 2 Volumen 96%igem Ethanol vermischt und 30 min bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet und je nach zu erwartender DNA Menge in TE resuspendiert. Die Konzentration der DNA wurde durch Vergleich mit den Banden des λ-Markers (EcoRI/HindIII geschnitten) bestimmt.

2.2.6 PCR und RT-PCR

PCR

Die Etablierung der PCR-Bedingungen für die Genotypisierung der geretteten Embryonen erfolgte in Anlehnung an Standard-PCR-Methoden (Sambrook et al. 1989; Innis et al. 1990). Die Genotypisierung der geretteten Embryonen erfolgte durch zwei PCR-Ansätze. Durch den ersten PCR-Ansatz wurden diejenigen Embryonen identifiziert, die für NKX-B2 heterozygot waren. Anschließend erfolgte durch die zweite PCR die Identifizierung von ErbB2 Homozygoten aus NKX-B2+/- heterozygoten Embryonen. In den meisten Fällen wurden beide PCR parallel durchgeführt.

Genotypisierung von ErbB2-/-R Embryonen (R: Rescue)

Zyklen: 30

Denaturierung: 94°C, 45 sec

Hybridisierung: 62°C, 10 sec

Elongation: 70°C, 20 sec

Primer:

RP-NKX: AGC ACC ACT CTC TGC TAC CCA

RP-B2: TAA GCT CCA AGT TGC CCT GCA

Genotypisierung von ErbB2-/- Embryonen

Zyklen: für WT 40; für Mut 35

Denaturierung: 94°C, 45 sec

Hybridisierung / Elongation: 72°C, 90 sec

Verzögerung: 1 sec

Primer:

ErbB2 Mut:

H) CCA CCC TCT CGC TCC AGC TGG TGG A

Z) CGG GCC TCT TCG TTA CGG GAG C

ErbB2 WT:

H) wie oben

G) GGG CTT ACA TCT AGA ACC CTT TTG TGG GC

Genotypisierung von ErbB3-/- Embryonen

Zyklen: 40

Denaturierung: 94°C, 45 sec

Hybridisierung/ Elongation: 72°C, 90 sec

Verzögerung: 1 sec

Primer:

neol: CGA ATT CGC CAA TGA CAA GAC GCT GG

Intron A1: GGG TGT CTG AGT CTT TGA AGC TGG AG

Exon A1: CCA GTG CAG GGA TCT TGT GCC AGG G

Schwanz Lysis Puffer

100 mM Tris-HCl pH 8,5

5 mM EDTA pH 8,0

0,2% W/V SDS

200 mM NaCl

100 µg/ml Proteinase K

Dottersack Lysis Puffer

50 mM KCl

3 mM MgCl₂

10 mM Tris-HCl pH 8,9

0,01% Gelatine

0,45% Nonidet P 40 (Sigma N-3516)

0,45% Tween 20 (Sigma P-1379)

100 µg/ml Proteinase K

RT-PCR

Die RT-PCR wurde mit der „SUPERScript™ ONE-STEP“ Kit von GIBCO-BRL durchgeführt. Dieses RT-PCR System besteht aus Reverse-Transkriptase/Tag Polymerase Mix und 2x Reaktionsmix, welcher einen optimierten Puffer, Mg²⁺, Desoxynukleotid, Triphosphat und Stabilisator enthält.

Für eine RT-PCR wurde der folgende 50 µl Ansatz zusammen pipettiert, vorsichtig durchmischt und kurz zentrifugiert.

25 ml 2 x Reaktionsmix

1 µl Templet RNA

1 µl Sense Primer (10 µM)

1 µl Antisense Primer (10 µM)

1 µl RT/Tag Mix

auf 50 µl mit H₂O

Die RT-PCR Zyklen wurden durch eine cDNA-Synthese und Prä-Denaturierung, PCR-Amplifikation sowie einen finalen Verlängerungsschritt vollzogen.

cDNA-Synthese und Prä-Denaturierung

45-55°C für 15-30 min

94°C für 2 min

1 Zyklus

PCR-Amplifikation

94°C für 15 sec

55-60°C für 30 sec

68-72°C 1 min/kb

35-40 Zyklen

Finaler Verlängerungsschritt

72°C für 5-10 min

1 Zyklus

2.2.7 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die Markierung von DNA durch „random Priming“ erfolgte in modifizierter Form nach dem von Feinberg und Vogelstein (1983) publizierten Protokoll. Diese Methode stellt ein Verfahren zur Synthese von radioaktiv markierten DNA-Molekülen höherer spezifischer Aktivität dar.

- 50-100 µg DNA wurden in 35 µg H₂O gelöst, 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt.
- Dazu wurden 5 µl Oligonukleotid-Mix, 5 µl [α -³²p]-dCTP und 5 U Klenow Enzym zugegeben und vier Stunden bei RT inkubiert. Dabei dient der in dem Oligolabelling-Mix enthaltene hexamere Primer als Startstelle für die Neusynthese von DNA durch die Klenow-Untereinheit der DNA-Polymerase I. So wird ein vollständig durchmarkierter DNA-Strang mit höherer spezifischer Aktivität erzeugt, der in Southern- und Northern-Hybridisierung eingesetzt werden kann. Die markierte DNA wurde von den nichteingebauten Nukleotiden über eine Sephadex G-50 Säule getrennt.

10x Oligolabelling-Mix

2,5 mg/ml Hexamere dN₆

100 mM MgCl₂

500 mM Tris pH 7.5

je 500 µm dATP, dGTP, dTTP

70 mM β -Mercaptoethanol

2.2.8 Southern-Blot-Transfer und Hybridisierung

Durch die Southern-Hybridisierung werden DNA-Fragmente, die im Agarosegel aufgetrennt wurden, in situ denaturiert und durch Diffusion von Gel auf eine Hybond-Membran transferiert. Somit wird einzelsträngige DNA für die Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden zugänglich gemacht und ihr autoradiographischer Nachweis ermöglicht. Bei der Hybridisierung wird das Prinzip der Ausbildung eines stabilen Doppelstranges zwischen komplementären Basenpaarungen ausgenutzt.

- Nach der Beendigung elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel photographiert und für die Durchführung von Southern-Blot-Transfer und Hybridisierung in seiner Größe reduziert.
- Anschließend wurde das Gel nacheinander mit den unten aufgeführten Lösungen behandelt.
- Durch leichtes Schütteln in 1,5 M NaCl/0,5 N NaOH erfolgte eine Denaturierung für 45 min bei RT.
- Danach wurde das Gel in 1 M Tris (pH 7,4) /1,5 M NaCl für 30-45 min leicht schwenkend neutralisiert.
- Eine mit zwei Lagen Whatman-Filterpapier bedeckte Plattform wurde in eine mit 20x SSC gefüllte Wanne gesetzt. Auf diese wurde zunächst das Gel, danach eine Hybond-Membran, zwei Lagen Whatman-3 MM Filterpapier und mehrere Lagen Filterpapier gestapelt und am Schluß ein geeignetes Gewicht darauf gesetzt.
- Der DNA-Transfer erfolgte über Nacht.
- Anschließend wurde die Hybond-Membran in 10x SSC kurz gespült und leicht luftgetrocknet.
- Die Fixierung der DNA auf der Hybond-Membran erfolgte durch zweistündiges Backen bei 80°C oder durch „UV-cross-Linken“.
- Um unspezifische Hybridisierung zwischen der Sonde und fixierter DNA zu vermeiden, wurde der Nylonfilter für 2 h bei 64°C prähybridisiert.
- Die eigentliche Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde erfolgte über Nacht bei 64°C.

- Anschließend wurde die Hybond-Membran jeweils für 15 min in 2x SSC/0,1% SDS; 0,5x SSC/0,1% SDS und 0,2x SSC/0,1% SDS gewaschen und leicht luftgetrocknet.

Prähybridisierungspuffer

5x Denhardtslösung

6x SSC

0,1% SDS

0,1 mg/ml salmsperm DNA

2.2.9 Etablierung transgener Mäuse

2.2.9.1 Kultur, Elektroporation und Selektion von ES-Zellen

ES-Zellkultur

Nach dem Auftauen wurden die ES-Zellen in ES-Medium aufgenommen und 3-5 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Danach wurden die ES-Zellen auf 35 mm Schalen kultiviert, die mit den Feeder-Zellen besät waren. Dabei produzierten die Feeder-Zellen eine die Proliferation fördernde Matrix sowie einen die Differenzierung verhindernden Faktor (LIF), wodurch die Kultivierung der ES-Zellen unter optimalen Bedingungen durchgeführt werden konnte. Das ES-Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, bis die einzelnen ES-Klone deutlich zu sehen waren. Anschließend wurden die Zellen kurz trypsinisiert, zentrifugiert und in einer 1:5 Verdünnung auf neuen Feeder-Zellen gehalten. Jeden Tag wurden die Zellen durch das Mikroskop inspiziert, damit ein infektionsfreies und normales Wachstum gewährleistet wird. Sobald die ES-Zellen eine geeignete Dichte erreichten, wurden sie noch einmal gesplittet und das Medium zweimal pro Tag gewechselt. Anschließend wurde ein Teil der Zellen eingefroren und der andere Teil für Elektroporation eingesetzt.

Elektroporation

Für die Elektroporation wurden die ES-Zellen trypsinisiert und mit einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml in PBS suspendiert. Etwa 750 µl dieser Suspension wurden in einer Elektroporationsküvette mit 20-25 µg linearisierter Plasmid-DNA (Targetingvektor)

gemischt und bei 240 V und 500 μ F elektroporiert (Bio Rad Gene Pulser). Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wurden die ES-Zellen auf vier 100 mm Kulturschalen (mit 10^4 Feeder-Zellen/Platte) ausgesät. Nach eintägiger Kultivierungszeit wurde das Medium vorsichtig gewechselt.

Selektion

48 h nach der Elektroporation wurde die Selektion durch Neomycin (G 418) mit einer Konzentration von 400 μ g/ml im ES-Medium gestartet. Die zusätzliche Selektion mit 2 μ M Gancyclovir erfolgte einen Tag nach der Neomycin-Selektion. Das Medium wurde jeden zweiten Tag vorsichtig gewechselt.

Picken von ES-Zellklonen

Etwa 7 bis 9 Tage nach der Elektroporation wurden resistente ES-Zellklone sichtbar, die vereinzelt vorlagen. Nach vorsichtigem zweimaligen Waschen mit PBS wurden die einzelnen Kolonien mit einer Pipette gepickt und in eine 96-Loch-Platte transferiert, in der 50 μ l PBS pro Loch vorlagen. Nach dem Vereinzeln der ES-Zellkolonien wurde eine Hälfte der ES-Zellen auf einer 96-Loch-Platte (mit Feeder-Zellen) kultiviert. Die andere Hälfte der ES-Zellen wurde auf einer gelatinisierten 96-Loch-Platte für die Southern-Blot-Analyse kultiviert. Die DNA Mikropräparation von 96-Loch-Platten erfolgte nach der Methode von Ramirez-Solis et al. (1992).

2.2.9.2 Superovulation

Für die Gewinnung von Blastozysten wurden superovulierte Tiere des Stammes C57Bl/6J verpaart. Die Superovulation erfolgte an 23-30 Tage alten Weibchen nach dem Protokoll von Hogan et al (1986). Als Ammenmütter wurden 2-5 Monate alte CB6F1 Weibchen (Balb/c x c57 Bl/6) verwendet. PMS (Intergonan) und hcG (Eukluton) wurden von der Vemie GmbH, Kempen gekauft und bei -20°C lyophilisiert gelagert.

2.2.9.3 Isolation von Blastozysten und Injektion von ES-Zellen

Zur Isolierung von Blastozysten wurden befruchtete Weibchen 3,5 Tage nach der Kopulation getötet, deren Uteri entnommen und unter PBS getrennt. Bei der Entnahme der Uteri wurde darauf geachtet, daß die anhängenden Eileiter nicht zerstört oder abgetrennt wurden. Anschließend wurden die Blastozysten durch Einstechen mit einer Kanüle in den Uterus kurz unterhalb des Eileiters mit 200-500µl Injektionsmedium (FE-Medium mit 30mM HEPES (pH 7,2) 1% 100mM Natriumpyruvat) herausgespült. Mit einer Mundkapillare wurden die Blastozysten unter dem Mikroskop gesammelt, ins Injektionsmedium überführt und unter Paraffinöl bei 37°C inkubiert. Für die Injektion wurden die ES-Zellen kurz trypsinisiert und im Injektionsmedium aufgenommen. Ungefähr 100µl Tropfen-Injektionsmedium wurden auf das Deckglas der Injektionskammer pipettiert und mit Silikonöl (Serva) überschichtet. Mit einer Mundkapillare wurden etwa 2000-2500 ES-Zellen und 20 bis 30 Blastozysten in den Tropfen gegeben. Anschließend wurde die Injektionskammer auf dem Objektisch des Mikroskops befestigt. Die Injektion der Blastozysten erfolgte an einem Axiovert 10 Mikroskop (Zeiss) mit seitlich befestigtem Mikromanipulator (Brindi). Die Halte- und Injektionsnadeln wurden abgesenkt und vorsichtig in den Tropfen eingefahren. 12 bis 15 ES-Zellen wurden bei einer 200-fachen Vergrößerung mit der Injektionsnadel aufgenommen. Mit der Haltenadel wurde eine Blastozyste so aufgespannt, daß sich seine innere Zellmasse an der Öffnung der Haltenadel befand. Danach wurde die Injektionsnadel mit einem kurzen Ruck in die Blastozyste gestoßen, die Zellen vorsichtig im Blastozoel abgelegt und die Nadel wieder herausgezogen. Bis zum Durchführen des Uterustransfers wurden die injizierten Blastozysten bei 37°C unter Paraffinöl inkubiert.

2.2.9.4 Uterustransfer von Blastozysten

Injizierte Blastozysten wurden in scheinschwangere Weibchen nach der Methode von Hogan et al. (1986) transferiert. Dafür wurden 2-5 monatige CB6F1 Weibchen verwendet, die mit einem sterilen Männchen verpaart wurden. Nach einer solchen Verpaarung durchlaufen die Weibchen alle hormonellen Veränderungen einer

normalen Schwangerschaft und sind daher für die transferierten Blastozysten empfänglich. Da die Blastozysten (Tag 3,5 p.c.) durch die in vitro Manipulation eine Entwicklungsverzögerung erfahren, wurden sie in Tag 2,5 p.c. schein-schwangere Weibchen transferiert. Für den Uterustransfer wurden die schein-schwangeren Weibchen mit Avertin (20 µl/g Körpergewicht) betäubt. Operativ wurden die Uteri freigelegt und am Übergang zum Infundibulum mit einer Kanüle eingestochen, um durch diese Öffnung 6-8 injizierte Blastozysten in jeden Uterus zu transferieren. Anschließend wurde das Peritoneum (Bauchfell) genäht und das Fell mit Autoclips geklammert (9 mm, Wound clips, Becton Dickinson comp.).

Avertin:

500 mg 2,2,2-Tribrom Ethanol
250 mg 2-Methyl-2-Butanol in
40 ml H₂O

Injektionsmedium:

FE-Medium mit
30 mM HEPES (pH 7,2)
1% 100 mM Natriumpyruvat

2.2.10 Immunologische Methoden

2.2.10.1 Immunofluoreszenzen auf geschnittenen Geweben

Gefrierschnitte von E12,5-E18,5 wurden wie folgt für die Immunofluoreszenzen-Färbung bearbeitet:

- Die Gewebeschnitte wurden für 10 min mit 4%iger PFA in PBS fixiert,
- 2x für 5 min in PBT (PBT mit 0,1% Tween 20) gewaschen,
- 1h in PBT mit 5%igem Ziegenerum blockiert,
- 1h in PBT mit 5%igem Ziegenerum und Primär-Antikörper bei RT inkubiert,
- 3x 5 min mit PBT gewaschen,
- 1h in PBT mit 5%igem Ziegenerum und Sekundär-Antikörper inkubiert,
- 3x 5 min gewaschen (je nachdem mit 1mg/ml DAPI gefärbt) und anschließend mit Mowiol eingedeckelt.
-

2.2.10.2 Whole Mount Immunofluoreszenzen

Für die Whole Mount Immunofluoreszenzen wurde das jeweilige Gewebe vorsichtig unter PBS präpariert. Anschließend wurde das Gewebe mit PFA fixiert und wie folgt weiter verarbeitet:

- 3 x 5 min mit PBS gewaschen,
- ÜN bei 4°C in PBT mit 5%igem Ziegenserum und Primär-Antikörper inkubiert,
- 2 x 15 min mit PBT gewaschen,
- ÜN bei 4°C in PBT mit 5%igem Ziegenserum und Sekundär-Antikörper inkubiert,
- 2 x 5 min mit PBT gewaschen und anschließend mit Mowiol eingedeckelt

2.2.10.3 Whole Mount Immunohistochemie

E10,5 bis E12,5 Embryonen wurden unter PBS aus dem Uterus isoliert und von dem umgebenden Gewebe und der Plazenta getrennt. Ein Teil des Dottersacks wurde für die Genotypisierung der Embryonen genutzt. Das Herz, das Gehirn und die Ohranlagen wurden mit Glaskapillaren punktiert, damit eine bessere Diffusion der Lösungen möglich wurde.

Anschließend wurden die Embryonen wie folgt weiterbearbeitet:

- Embryonen ÜN bei 4°C mit 4%iger PFA in PBS leicht schüttelnd fixieren,
- 2x 30 min in PBT (PBS mit 0,1% Tween 20),
- 1h bei RT in Methanol : H₂O₂ (4:1) die Embryonen bleichen,
- 2 x 5 min leicht schüttelnd in PBT waschen,
- ÜN mit dem Erstantikörper und 5%igem Ziegenserum in PBT bei RT oder bei 4°C inkubieren,
- 3 x 30 min mit PBT bei RT waschen,
- ÜN bei RT oder bei 4°C mit dem Zweitantikörper und 5%igem Ziegenserum in PBT inkubieren,
- waschen wie nach der Inkubation mit dem Erstantikörper.

- Für die Farbreaktion wurden die Embryonen in 2 ml PBT /DAB/0,1 M NiSO_4 für 10 min inkubiert und anschließend mit 0,0003%igem H_2O_2 versetzt.
- Nach der Farbreaktion wurden die Embryonen in Benzyl-Alkohol:Benzyloxybenzoate (1:2) gekleart.

2.2.11 Histologische Methoden

2.2.11.1 Herstellen von Methacrylatschnitten

Für die histologische Analyse wurden Gewebe und Embryonen in Hydroxyethyl-Methacrylat (kaltpolymerisierender Kunststoff) eingebettet. Dafür wurden mit 4%igem PFA fixierte Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (25%, 50%, 70%, 90%) je 5 h bis über Nacht dehydriert. Anschließend wurden die Präparate 3 h bis über Nacht in Technovit 7100/100%igem Ethanol (1:1) präinfiltiert und danach in Infiltrationslösung (1g Härter I in 100 ml Technovit 7100) überführt. Die Präparate wurden dann in Histoformen orientiert und mit Einbettlösung (6,66% Härter II in Infiltrationslösung) überschichtet. Nach dem Aushärten des Kunststoffs wurden die Präparate mit Technovit 3040 auf Histoblöcke gekittet und bis zum Schneiden bei RT aufbewahrt. Abschließend wurden die Schnitte in gewünschter Dicke angefertigt, im lauwarmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger aufgezogen und auf einer Wärmplatte getrocknet.

2.2.11.2 Herstellen von Kryoschnitten

Nach dem Spülen in PBS wurden die Embryonen und das Gewebe mit TissueTec in einer Alkohol/Trockeneis Mischung in einer Einfrierform oder in Aluminiumhütchen eingefroren. Die so eingefrorenen Präparate können mehrere Wochen bei -70°C aufbewahrt werden. Die zu analysierenden Gewebe und Embryonen wurden im Kryostaten bei -20°C mit TissueTec auf der Halterung fixiert und anschließend durch Trimmen an die Region herangetastet, von wo aus das Schneiden erfolgte. In Abhängigkeit von der Gewebeart und dem Alter der Embryonen wurde die Blocktemperatur zwischen -18°C und -20°C und die

Schnittdicke zwischen 8-12 µm variiert. Die Schnitte wurden auf Starfrost-Objekträger aufgezogen, getrocknet und für die Hybridisierung eingesetzt oder bei -20°C (bzw. bei -70°C) eingefroren.

2.2.11.3 Whole Mount in situ Hybridisierung

E10,5 bis E12,5 Embryonen wurden unter PBS aus dem Uterus isoliert und von der Plazenta sowie umgebenden Geweben getrennt. Dabei wurde der Dottersack für die Genotypisierung der Embryonen benutzt. Um besseren Zugang für die Lösungen zu ermöglichen, wurden das Herz, das Gehirn und die Ohranlagen mit einem ausgezogenen Glaskapillar punktiert. Die Embryonen wurden wie folgt weiterbearbeitet:

- Embryonen ÜN bei 4°C mit 4%iger PFA in PBS fixieren,
- 2x5 min in PBT waschen (PBS mit 0,1% Tween 20),
- jeweils 10 min in 25%, 50%, 75% und 100%igem Methanol, gemischt mit PBT auf Eis dehydrieren,
- 1x 10 min in 100%igem Methanol auf Eis inkubieren,
- Embryonen können an dieser Stelle in Methanol ÜN bis mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.
- 1 h bei RT in Methanol : H₂O₂ (4:1) bleichen,
- jeweils 10 min in 75%, 50%, 25%igem Methanol auf Eis oder bei 4°C rehydrieren,
- 3x 5 min mit PBT auf Eis waschen,
- 5-10 min bei RT 20 µg/ml Proteinase K in PBT unter leichtem Schütteln inkubieren,
- 3x 5 min mit PBT bei RT unter leichtem Schütteln waschen,
- 20 min mit 4%igem PFA und 0,2%igem Glutaraldehyd in PBS fixieren,
- 3x 5 min bei RT unter leichtem Schütteln waschen,
- 5 min mit dem Prähybridisierungsmix bei 70°C leicht schüttelnd inkubieren,
- 1 h mit dem Prähybridisierungsmix bei 70°C leicht schüttelnd inkubieren,

- ÜN bei 70°C mit der Hybridisierungslösung leicht schüttelnd inkubieren (2 ml Prähybridisierungsmix, 5-10 µl denaturierte Riboprobe und 50 µl Formamid),
- 2x 30 min in vorgewärmter Lösung I leicht bei 70°C leicht schüttelnd inkubieren,
- 10 min in Lösung I/II leicht schüttelnd inkubieren,
- 3x 5 min in Lösung II bei RT leicht schüttelnd inkubieren,
- 2x 30 min mit 50 µg/ml RNase A in Lösung II bei 37°C leicht schüttelnd inkubieren,
- 2x 1 h in Lösung III bei 65°C leicht schüttelnd inkubieren,
- 3x 5 min bei RT leicht schüttelnd waschen,
- 1 h in TBST/10%igem Ziegen Serum bei RT leicht schüttelnd inkubieren,
- während dieser Zeit eine Spatelspitze Embryopulver in 2ml TBST für 30 min bei 70°C inaktivieren,
- für 10 min bei 5000rpm, 4°C zentrifugieren,
- das Pellet auf Eis abkühlen und pro Ansatz 0,5 ml TBST/1%igem Ziegen Serum und 1 µl Anti-Digoxigenin Antikörper hinzugeben, mischen und für 1h bei 4°C leicht schüttelnd inkubieren,
- zentrifugieren für 5 min bei 5000rpm, 4°C,
- den Überstand 4x mit TBST/1%igem Ziegen Serum verdünnen,
- ÜN bei 4°C in Anti-Digoxigenin-Lösung (2ml pro Ansatz) inkubieren,
- den ganzen Tag durch stündliches Wechseln mit TBST waschen,
- ÜN bei 4°C in TBST leicht schüttelnd behandeln,
- 2x10 min mit alkalischem Phosphatasepuffer bei RT leicht schüttelnd inkubieren,
- anschließend filtrierte Farblösung (2 ml alkalische Phosphatasepuffer, 9 µl NTB, 7 µl BCIP) hinzugeben und im Dunkeln färben.
- Um eine Überfärbung zu vermeiden, wurde die Farbreaktion in 30-minütigem Abstand unter dem Mikroskop inspiziert.
- Anschließend erfolgte das Stoppen der Farbreaktion durch zwei- bis dreimaliges Waschen mit TBST.
- Für das photographische Dokumentieren wurden die Embryonen in 75%iges Glycerol überführt und in dieser Lösung bei 4°C aufbewahrt.

Präparation von Riboproben

1 µl (1 µg/µl) auf Eis linearisierte Plasmid-DNA

13 µl H₂O_{DEPC}

2 µl DIG RNA-Labeling Mix

2 µl 10x Transkriptionspuffer

1 µl (20U)RNase Inhibitor

1 µl RNA-Polymerase (T7, T3, SP6)

- 1 h bei 37°C inkubieren und die Reaktion auf Eis stoppen,
- 2,5 µl 4M LiCl und 75 µl Ethanol (-20°C) zugeben und mischen,
- 30 min bei -70°C präzipitieren,
- 15 min bei 13000 rpm, 4°C zentrifugieren,
- mit 50 µl 70%igem Ethanol waschen,
- in 50 µl H₂O_{DEPC} lösen,
- 50 µl Formamid zugeben,
- 5 -10 µl auf Agarosegel auftragen und die RNA-Konzentration bestimmen und bei -70°C lagern.

Lösungen:**PBT**

100 ml PBS

100 µl Tween 20

10xTBST

8,0g NaCl

0,2g KCl

2,5 ml 1M Tris, pH 7,4

100 µl Tween 20

auf 100 ml mit H₂O_{DEPC}

AP-Puffer

2 ml 5M NaCl

10 ml 1M Tris pH9,5

5 ml 1M MgCl₂

100 µl Tween 20

auf 100 ml mit H₂O_{DEPC}

Lösung I

25 ml Formamid
12,5 ml 20x SSC
50 µl Tween 20
auf 50 ml mit H₂O_{DEPC}

Lösung II

0,5 ml 1M Tris pH 7,5
5 ml 5M NaCl
50 µl Tween 20
auf 50 ml mit H₂O_{DEPC}

Lösung III

25 ml Formamid
5 ml 20x SSC
50 µl Tween 20
auf 50 ml mit H₂O_{DEPC}

Prähybridisierungsmix

12,5 ml Formamid
6,25 ml 20x SSC
10 µl Salmon Sperm DNA (10 mg/ml)
125 µl tRNA (10 mg/ml)
25 µl Tween 20
1-2 ml 1M Citratsäure
(um pH4,5-5 einzustellen)
auf 25 ml mit H₂O_{DEPC}

2.2.11.4 In situ Hybridisierung auf Gefrierschnitten

Die Kryostatschnitte wurden aus dem Kühlschrank (-70 °C) entnommen und über mehrere Stunden aufgetaut. Anschließend wurden die Schnitte wie folgt weiter bearbeitet:

- 20 min in 4%igem PFA (in PBS) fixieren,

- 2x 3 min mit PBS waschen,
 - 5-10 min in 50 mM Tris (pH 7,5), 1mM EDTA (pH8,0), 20 mg/ml Proteinase K inkubieren,
 - 3 min mit PBS waschen,
 - 10 min in 4%igem PFA (in PBS) fixieren,
 - 1 min mit H₂O waschen,
 - 10 min in 200 ml ddH₂O mit 3,5 ml Triethanolamin, 550 µl Essigsäureanhydrid (Essigsäureanhydrid erst direkt vor der Inkubation zugeben und leicht rühren),
 - 3 min mit PBS waschen,
 - je 1 min in 30%, 50%, 70%, 90%, 96% und 100%igem EtOH dehydrieren,
- 1-2 h bei RT trocknen lassen.

In der Zwischenzeit wird die Vorbereitung der Deckgläser vorgenommen. Die Deckgläser wurden in Sigmacote eingetaucht und getrocknet. Anschließend wurden die Deckgläser in EtOH gewaschen und erneut getrocknet.

- Für die Hybridisierung wurden die markierten Sonden mit einer Konzentration von 50000 cpm/µl in der Hybridisierungslösung aufgenommen.
- Nach zweiminütigem Denaturieren bei 95 °C und Abkühlen auf Eis wurden die Proben mit 1/10 Volumen 1M DTT gemischt.
- Von dieser Lösung wurden auf jeden Objektträger je 40 µl (~2x 10⁶ cpm) gegeben.
- Anschließend wurde der Objektträger mit dem Deckglas bedeckt und die Flüssigkeit durch leichten Druck verteilt.
- Die Hybridisierung erfolgte in einer vorgewärmten Feuchtigkeitskammer (50%iges Formamid und 5x SSC) ÜN bei 58-60 °C.
- Am nächsten Tag wurden die Deckgläser durch leichtes Schütteln in 5x SSC, 1M DDT bei 65 °C für 20 min abgestreift.
- Anschließend wurden die Objektträger zur Reduzierung des Hintergrundes folgenden Waschschritten unterzogen:
- 15 min 37°C in RNase-Lösung (0,5 M NaCl, 10 mM Tris pH 7, 10 mM EDTA),
- 30 min 37°C in RNase-Lösung mit 20 µg/ml RNase A,
- 15 min in RNase-Lösung,

- 1-2h bei 65 °C in 50%igem Formamid, 2x SSC, 1mM DTT,
- 30 min bei 65°C in 2x SSC, 1mM DTT,
- 30 min 65°C in 0,2x SSC, 1mM DTT.
- Danach wurden die Objektträger kurz abgekühlt und für je 2 min in PBS, 30%, 50%, 70%, 90%, 96% und 100%igem EtOH dehydriert.
- Nach zweistündigem Trocknen wurden die Objektträger auf einem Film ÜN exponiert. Anschließend wurden die Objektträger in der Dunkelkammer in eine Photoemulsion eingetaucht, getrocknet und im Dunkeln bei 4°C bis zur Entwicklung aufbewahrt.
- Nach 14 Tagen wurden die Objektträger zum Entwickeln 1-2h bei RT stehen gelassen und mit folgenden Lösungen inkubiert:
 - 3 min Kodak D-19 Entwickler,
 - 1 min 1%ige Essigsäure,
 - 3 min 30%iges Natriumthiosulfat,
 - 5 min ddH₂O,
 - 20 min ddH₂O (pH 6,0),
- Zum Anfärben der Organe wurden die Objektträger 30 min in Giemsa-Lösung inkubiert und für 5 min mit H₂O gewaschen.
- Anschließend wurden die Objektträger ÜN getrocknet und mit Korbit-Balsam eingedeckelt.

Lösungen:

Hybridisierungsmix:

50% Formamid

0,3 M NaCl

20 mM Tris-HC, pH 8,0

5 mM EDTA, pH 8,0

10% Dextransulfat

1x Denhardts Lösung

0,5 mg/mRNA

Giemsa Lösung:

8 ml Giemsa-Stocklösung
4 ml Natriumphosphat Puffer pH 6,2
188 ml ddH₂O

2.2.11.5 Histologische Färbmethoden

Hämatoxillin- und Eosin-Färbung

Die Gewebeschnitte wurden 5 min in filtrierter Hämatoxillin-Lösung gefärbt und danach für 10 min unter Leitungswasser gespült. Anschließend wurden die Objektträger in deionisiertem Wasser gespült und 2 min in Eosin-Lösung gefärbt. Nach gründlichem Waschen mit deionisiertem Wasser wurden die Objektträger getrocknet und mit Korbit-Balsam eingedeckelt.

Hämatoxillin-Lösung:

1,5 g Hämatoxillin
0,15 g Natrium Iodate
13,2 g Aluminium sulfate
162,5 ml Ethylenglycol
172,5 ml destilliertes H₂O
15 ml Essigsäure

Eosin Lösung:

0,5 g wasserlösliches Eosin
2-3 Tropfen Essigsäure
100 ml destilliertes H₂O

Toludin-Blau-Färbung

Für die Toludin-Blau-Färbung wurden die Methacrylatschnitte mit 1%iger Toludin-Blau Lösung 1 bis 5 Minuten gefärbt und anschließend mit Wasser gespült. Bei einer zu intensiven Färbung wurden die Schnitte kurz in 70%igem Ethanol

differenziert. Nachdem die Schnitte erneut mit Wasser gespült wurden, wurden sie getrocknet und mit Korbit-Balsam eingedeckelt.

AChE-Färbung

Das zu färbende Gewebe wurde zweimal in PBS gespült und anschließend in 2%igem PFA über Nacht fixiert. Danach wurde das Gewebe zweimal für 15 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Färbereaktion in folgender Lösung durchgeführt:

- 1,7 mM Acetylcholiniodide (Sigma)
- 0,5 mM Kalium Ferricyanide
- 3 mM Kupfer Sulfate
- 5 mM Natriumcitrate
- 65 mM Natrium hydrogen maleate (pH6)
- 10% Sucrose

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion des „knock in“ Targetingvektors

Embryonen, die eine homozygote ErbB2 Mutation tragen, sterben am E10,5 der Embryonalentwicklung wegen eines morphogenetischen Defekts im Herzen. Eine der Strategien für die Behebung dieses Defekts ist die herzspezifische Expression von ErbB2 in den mutanten Embryonen. Dadurch wurde die Untersuchung der Funktionen von ErbB2 in den späteren Entwicklungsphasen möglich. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde ein Targetingvektor konstruiert, der es ermöglicht, ErbB2 cDNA unter der Kontrolle eines herzspezifischen Promotors zu exprimieren. Für diesen Zweck wurden drei Subklone des Maus Nkx2.5 Gens (#544, #543, #381) und die ErbB2 cDNA der Ratte verwendet. Nkx2.5 ist ein Homeodomän-Transkriptionsfaktor, der ab E7,7 im Myokard exprimiert wird (Lints et al. 1993). Im Verlauf der Konstruktion des Targetingvektors wurden Sequenzen, die am 5' vom Nkx2.5 Promotor lokalisiert sind sowie der Promotor mit AUG Startkodon (Exon 1), an die ErbB2 cDNA fusioniert. Dieses Konstrukt ergab den langen Arm des Vektors. Der Targetingvektor enthielt zusätzlich Selektionsmarker (Neomycin-Resistenzgen, Neo und Thymidinkinase-Gen von Herpes simplex, TK), die im pTV-O Grundvektor vorhanden waren. Der pTV-O wurde durch den Einbau eines XhoI Linkers an der HindIII Schnittstelle modifiziert; in die XhoI Schnittstelle wurde der kurze Arm, der Exon 2 des Nkx2.5 Gens enthält, inseriert; der kurze Arm ist damit von den Selektionsmarkergenen Neo und TK flankiert. Anschließend wurde durch das Zusammensetzen der beiden Teile der vollständige Targetingvektor zusammengesetzt (Abb. 4A). Durch die genomischen Fragmente des Nkx2.5 Gens, die in den Armen des Targetingvektors eingebaut sind, erfolgte die homologe Rekombination des Vektors in den Nkx2.5 Locus. Somit wurde sichergestellt, daß die ErbB2 cDNA herzspezifisch, unter der Kontrolle des Nkx 2.5 Promotors exprimiert wird.

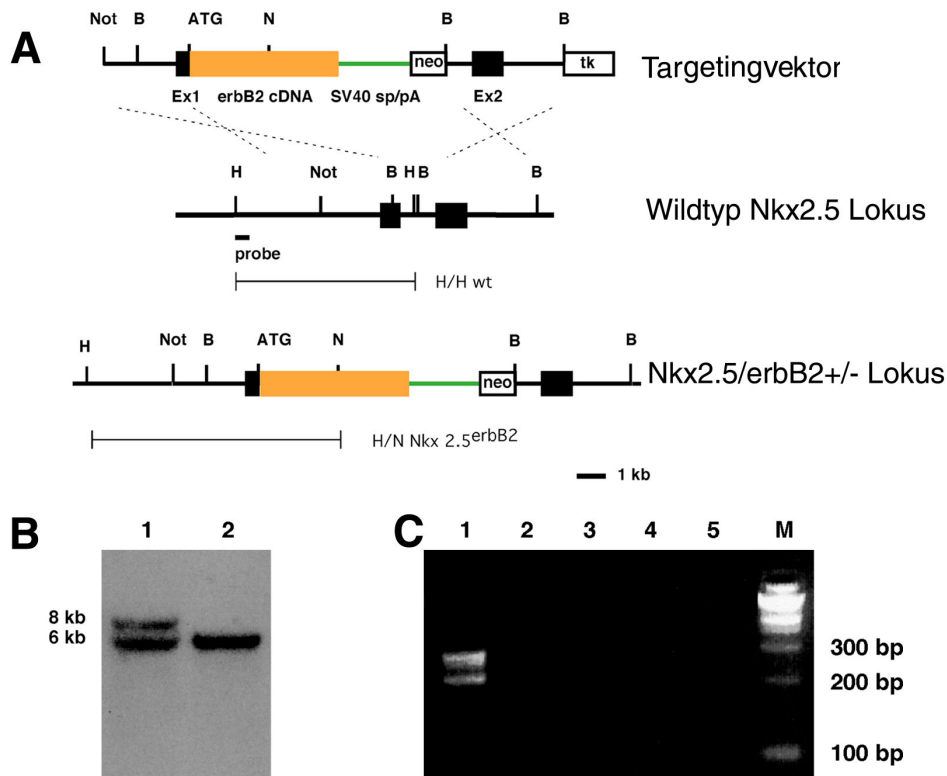


Abbildung 4: Aufbau des Nkx2.5^{ErbB2} Targetingvektors.

(A) Der Promotor des Nkx2.5 Gens mit dem AUG Startkodon (Exon 1) sowie oberhalb von ihm gelegene Sequenzen (schwarz, links) wurden mit der ErbB2 cDNA (orange) und mit der, den SV40 Spleiß-Akzeptor und -Donor umfassenden, Region (grün) fusioniert. Exon 2 und angrenzende Sequenzen des Nkx2.5 Gens flankieren die Selektionsmarker-gene Neo und TK (schwarz, rechts) und dienen dabei als kurzer Arm des Targetingvektors. Im mittleren Teil der Abbildung ist der Wt Nkx2.5 Lokus und die für die Southern-Hybridisierung eingesetzte Probe gezeigt. Weiterhin sind in (A) die nach der enzymatischen Spaltung mit HindIII und NcoI entstandenen 6kb (Wt) und 8kb (Nkx2.5-ErbB2^{+/-}) langen Fragmente eingezeichnet. Die Abbildung (B) zeigt die Autoradiogramme der Southern-Blot-Analyse. (C) Durch RT-PCR mit der Gesamt-RNA aus dem Herzen (Slot 1), den Interkostalmuskeln und dem Zwerchfell (Slot 2), den Extremitätenmuskeln (Slot 3) und dem Gehirn (Slot 4) wurde die Spezifität der Expression des Nkx2.5^{ErbB2} untersucht. Als negative Kontrolle wurde ein Reaktionsansatz ohne RNA (Slot 5) aufgetragen. Die für die RT-PCR eingesetzten Primer hybridisieren an den 3'-untranslatierten Sequenzen, die oberhalb und unterhalb der SV40 Spleiß-Stellen liegen.

3.2 Etablierung von Mauslinien mit dem Nkx-B2^{+/-}/B2^{-/-} Genotyp

Nach der Linearisierung wurde der Targetingvektor durch Elektroporation in embryonale Stammzellen eingebracht. Die verwendete ES-Zelllinie, E14.1, stammt aus dem Stamm 129/Ola, der eine agouti (gelbe) Fellfarbe besitzt. ES-Zellen, die für

G418 und Gancyclovir doppelresistent waren, wurden mittels Southern-Blot-Analyse auf homologe Rekombination mit einer markierten Sonde überprüft, die außerhalb der integrierten DNA lag. Von den insgesamt 1200 getesteten ES-Zellklonen konnten 6 Klone identifiziert werden, in denen der Vektor über homologe Rekombination in den Nkx2.5 Locus integriert wurde. Somit lag die Frequenz der homologen Rekombination bei 0,5%. Die Frequenz einer homologen Rekombination kann durch die Zugänglichkeit des Locus für die Rekombination, durch die Länge der zu rekombinierenden Fragmente sowie durch die Länge der Arme des Targetingvektors beeinflusst werden.

Nach Injektion von drei doppelresistenten Klonen in Blastozysten des Mausstammes C57 BL/6J wurden die Blastozysten in scheinschwangere Weibchen des Stammes CB6F1 transferiert. Die aus diesen injizierten Blastozysten hervorgegangenen chimären Böcke wurden nach ihrer Geschlechtsreife mit C57 BL/6J Weibchen verpaart. C57 BL/6J Tiere besitzen eine schwarze Fellfarbe. Aus der Weitergabe des ES-Zellgenoms an die Nachkommenschaft (Keimbahngängigkeit) resultierten Nachkommen mit brauner Fellfarbe, die durch die Mischung der Fellfarbe-Gene aus C57BL/6J (schwarz) und 129 Ola (agouti) zustande kam. Alle drei ES-Zellklone zeigten Keimbahn-Transmission. Durch PCR und Southern-Blot-Analyse wurden die braunen Nachkommen aus dieser Verpaarung analysiert, um festzustellen, ob sie in ihrem Genom die ErbB2 cDNA im Nkx 2.5 Locus tragen.

In etwa der Hälfte der braunen Nachkommen wurde die korrekte Integration der ErbB2 cDNA im Nkx2.5 Locus bestätigt. Sowohl die Chimären als auch die Nkx-ErbB2^{+/-} Tiere zeigten keine abnormen Veränderungen im Herzen. Die äußere Erscheinung sowie die Fertilität der Nkx-ErbB2^{+/-} Tiere war von den gleichaltrigen Wildtypmäusen kaum zu unterscheiden. Um Embryonen zu erzeugen, die im ErbB2^{-/-} genetischen Hintergrund das Gen nur unter der Kontrolle des Nkx2.5 Promotors im Herzen exprimieren, wurden die Nkx-ErbB2^{+/-} Tiere mit den ErbB2^{+/-}

Tieren verpaart. Nach dem Expandieren der aus dieser Verpaarung entstandenen doppelheterozygoten Tiere (Nkx-ErbB2/ErbB2+/-) erfolgte die Herstellung und Untersuchung von Embryonen mit dem Genotyp Nkx-ErbB2+/-/ErbB2-/-.

3.3 Überlebensrate von geretteten Embryonen

Die Verpaarung von doppelheterozygoten Tieren (Nkx-ErbB2/ErbB2+/-) miteinander oder die Verpaarung von Nkx-ErbB2+/- Böcken mit ErbB2+/- Weibchen ergab lebend geborene mutante Tiere. Diese Tiere starben einige Minuten nach der Geburt. Von ihrem äußeren Aussehen waren die Nkx-ErbB2/ErbB2-/ -mutanten Tiere von ihren Doppelheterozygoten oder Wildtypwürfen eindeutig zu unterscheiden. Zusätzlich zu ihren Vorderbeinen, die sich zum Brustkorb und zur Bauchwand hin gezogen befanden, zeigte ihr Kopf eine ausgeprägte Neigung in Richtung der Hinterbeine (Abb. 5b). Das erste Auftreten dieses Phänotyps wurde am E15,5 beobachtet, wobei ab E16,5 dessen Ausmaß verstärkt sichtbar wurde. Bewegungsstimulation mit spitzen Objekten führte zu einer langsamen Bewegungsreaktion, die nur nach mehrfach wiederholter Stimulation zustande kam. Die Genotypisierung der lebenden Tiere in verschiedenen Entwicklungsstadien ergab, daß am E10,5 und E12,5 etwa 1/8 der Embryonen einen Nkx-B2/B2^{-/-} Genotyp besaßen. Dies entspricht der erwarteten Verteilung nach Mendel.

Die Null-Mutation im ErbB2 Gen führte am E10,5 der Embryonalentwicklung wegen eines morphogenetischen Defekts im Herzen zum Sterben der Embryonen. Die herzspezifische Expression von ErbB2 cDNA unter der Kontrolle des Nkx2.5 Promotors verhinderte also das frühe Sterben dieser Embryonen. Allerdings hatten in späteren Entwicklungsstadien (E14,5 und E18,5) nur etwa 5% der lebenden Tiere einen Nkx-B2/B2^{-/-} Genotyp. Dies zeigt, daß diese Tiere Defekte entwickeln, die mit dem Überleben der Embryonen nicht vereinbar sind. Ähnliches wurde zuvor auch für ErbB3^{-/-} Tiere beobachtet .

Tabelle 1: Überlebensrate von ErbB2^{-/-}R Embryonen zwischen Tag 10,5 und 18,5 der Embryonalentwicklung.

Genotyp der Eltern	Nkx2.5 ^{ErbB2} /+; ErbB2+/- x Nkx2.5+/+; ErbB2+/-												
Genotyp der Nachkommen	Nkx2.5 ^{ErbB2} /+						Nkx2.5+/+						
	ErbB2+/+		ErbB2+/-		ErbB2-/-		ErbB2+/+		ErbB2+/-		ErbB2-/-		
erwartete Anzahl in %	12,5%		25%		12,5%		12,5%		25%		12,5%		Summe
E10.5	3	10%	8	27%	4	13%	4	13%	8	27%	3	10%	30
E12.5	12	16%	18	25%	9	12%	8	11%	26	36%	0	0%	73
E14.5	15	18%	26	31%	4	5%	13	15%	27	32%	0	0%	85
E15.5	26	16%	48	29%	8	5%	28	17%	56	34%	0	0%	166
E16.5	21	17%	39	32%	9	7%	20	16%	33	27%	0	0%	122
E18.5	21	18%	37	32%	7	6%	17	15%	33	29%	0	0%	115

Genotypische Analyse von Embryonen aus der Verpaarung von Nkx2.5^{ErbB2}/+; ErbB2+/- X Nkx2.5+/+; ErbB2+/- . Zur Genotypisierung der Embryonen wurde DNA aus den Dottersäcken isoliert und mittels PCR analysiert. Die erwartete Mendelsche Verteilung von E10,5-E18,5 ist angegeben. Darunter ist die tatsächliche Anzahl genotypisierter Embryonen gezeigt. Zusätzlich zu lebend geborenen Embryonen (Nkx2.5^{ErbB2}/+; ErbB2^{-/-}) wurden auch Embryonen gefunden, die keinen Herzschlag aufwiesen oder bereits teilweise resorbiert waren. Der Genotyp von Nkx2.5^{-/-}; ErbB2^{-/-} Embryonen wurde nicht berücksichtigt.

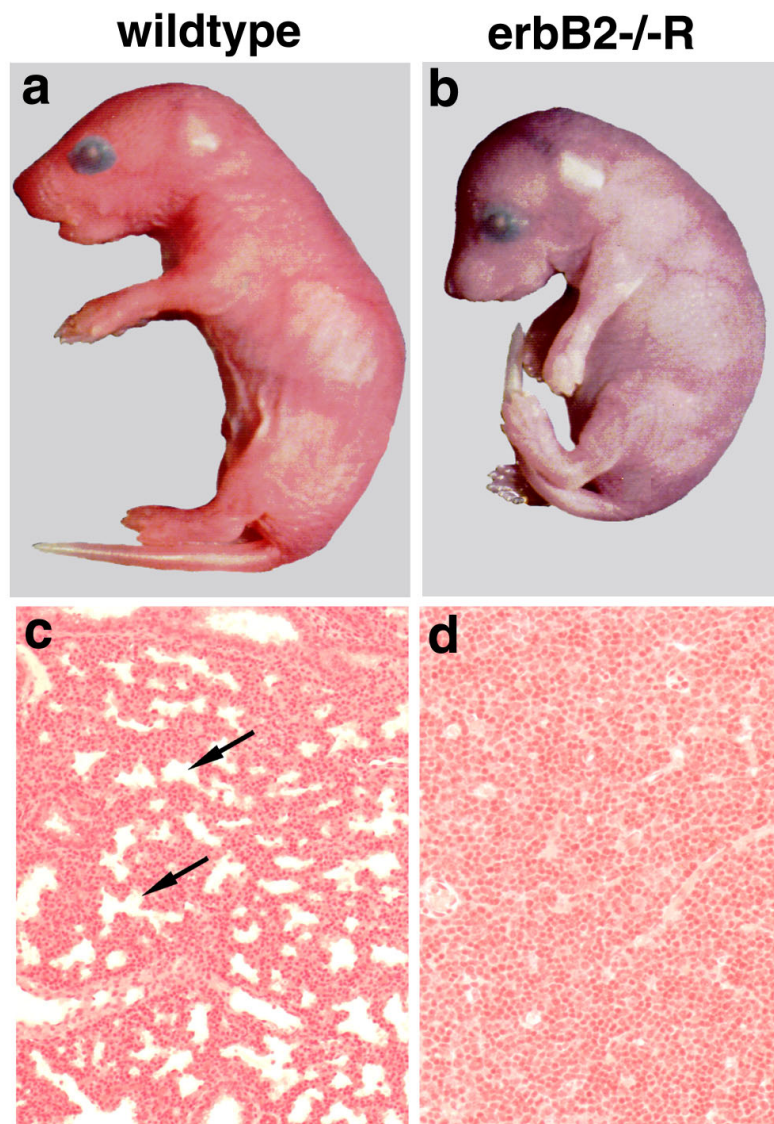


Abbildung 5: Äußeres Aussehen und Histologie der Lunge von ErbB2-/-R Embryonen.

Sowohl die geretteten ErbB2-/-R als auch ErbB3-/- Tiere sehen am Tag 18,5 oder bei der Geburt wie in der Abbildung (b) dargestellt aus. Die Hämatoxyllin/Eosin-Färbung ihrer Lunge zeigt, daß die Alveolen nicht entfaltet sind (d).

3.4 Die essentielle Funktion von ErbB2 in der Herzentwicklung

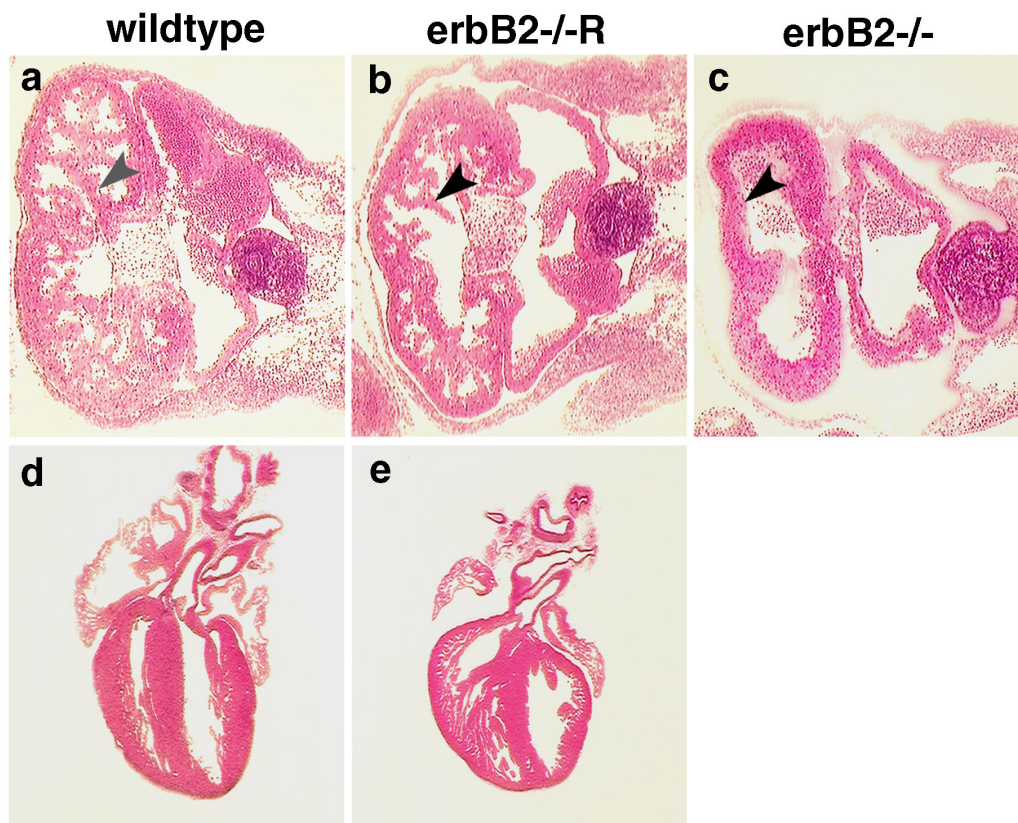
Durch RT-PCR wurde die Spezifität der Expression des ErbB2 Gens in verschiedenen Geweben der mutanten Embryonen ($Nkx-B2/B2^{-/-}$) untersucht. Diese Analyse zeigte, daß unter der Kontrolle des Nkx2.5 Promotors, wie erwartet, keine Expression des ErbB2 Gens im Gehirn, in den Muskeln der Extremitäten sowie im

Zwerchfell stattfand. Dagegen wurde die herzspezifische Expression von ErbB2 eindeutig nachgewiesen (Abb. 4C).

Histologische Untersuchungen von geretteten Embryonen am E10,5 der Embryonalentwicklung zeigten eine normale Bildung von Trabekeln aus Muskelzellen des Herzventrikels. Im Vergleich zu Kontrollherzen war die Größe der Trabekel in den Herzen der geretteten Embryonen allerdings geringer (Abb. 6b). Histologische Analysen von E18,5 Tieren zeigten keine Veränderungen in der Entwicklung des Herzens (Abb. 6e). Im Vergleich zu den Herzen aus Kontrolltieren waren die Herzen der geretteten *Nkx-B2/B2*^{-/-} Tiere kleiner; allerdings sind diese Tiere insgesamt kleiner. Verglichen mit Kontrolltieren war das Körpergewicht um etwa 1/3 reduziert.

Abbildung 6: Histologische Analyse des Herzen am Tag 10,5 (a, b, c) und Tag 18,5 (d, e) der Embryonalentwicklung.

Die Pfeile zeigen auf die Trabekel bei den Wildtypembryonen (a) und den geretteten *ErbB2*^{-/-R} Embryonen (b). Bei den *ErbB2*^{-/-} Embryonen (c) sind diese Strukturen nicht vorhanden. Die Morphologie des Herzen am E18,5 der Embryonalentwicklung ist für die Kontrollembryonen (d) und für die geretteten *ErbB2*^{-/-} Embryonen (e) gezeigt.



3.5 Das Fehlen von Schwann'schen Zellen an den peripheren Axonen

Die ErbB Rezeptor-Tyrosinkinase wird während der gesamten Entwicklung in Schwann'schen Zellen exprimiert, d.h. in den Neuralleistenzellen, Vorläufern und reifen Schwann'schen Zellen (Jin et al. 1993). Dementsprechend wurden diese Zellen während der Embryonalentwicklung zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Histologische Untersuchungen von Nkx-ErbB2/ErbB2-/-Tieren (E12,5) zeigten, daß entlang der Spinalnerven kaum Vorläufer der Schwann'schen Zellen auftraten, während eine Vielzahl solcher Zellen, mit den Nerven assoziiert, in Kontrolltieren vorhanden waren.

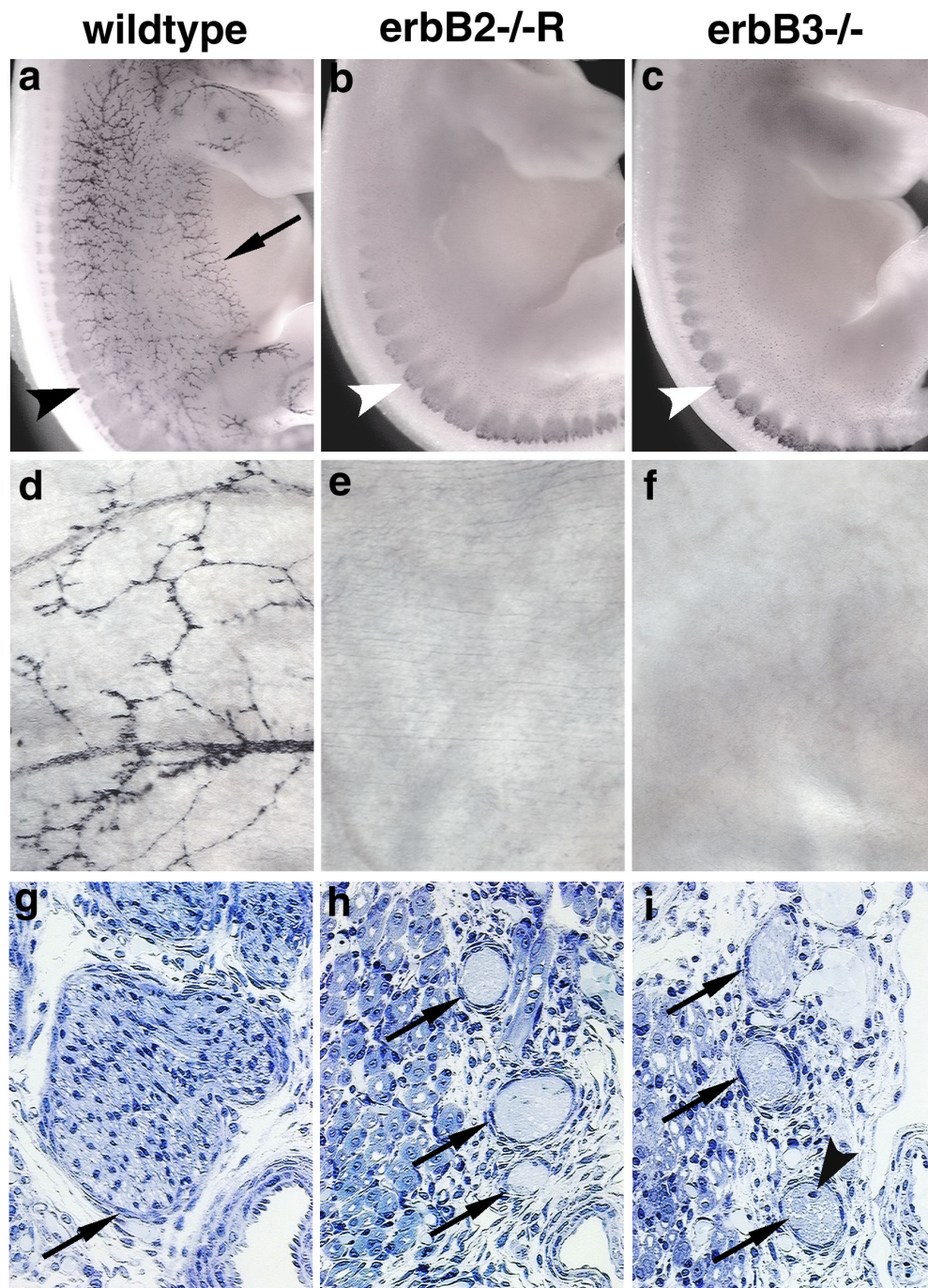


Abbildung 7: Das Fehlen von Schwann'schen Zellen bei den geretteten ErbB2-/-R sowie bei den ErbB3-/- Embryonen.

Die Whole Mount in situ Hybridisierungsanalyse von Kontrollembryonen (a); ErbB2-/-R (b) und ErbB3-/- (c) Embryonen wurde mit Sox10 spezifischen Riboproben durchgeführt. Am E12,5 der Embryonalentwicklung fehlten bei den mutanten Embryonen (ErbB2-/-R und ErbB3-/-) Vorläufer der Schwann'schen Zellen, die mit den peripheren Nerven assoziiert vorkommen (Pfeilspitzen in b und c). Weitere Whole Mount in situ

Hybridisierungen am E15,5 auf vorsichtig präparierten Brustkörben zeigten, daß im Vergleich zu den Kontrollembrionen (d) bei den ErbB2-/-R (e) und ErbB3-/- (f) Mutanten keine Schwann'schen Zellen vorhanden sind. Die unteren Abbildungen zeigen histologische Analysen der Axonenbündel des Plexus brachialis von Wt (g), ErbB2-/-R (h) und ErbB3-/- (i) Embryonen. Die Pfeile in g-i zeigen zu den mesenchymalen Zellen des Perineuriums. Im Vergleich zu den Kontrollembrionen (g) sind bei den mutanten Embryonen kaum Schwann'sche Zellen innerhalb der Axonenbündel des Plexus brachialis vorhanden.

Im weiteren wurde dieser Phänotyp genauer analysiert und mit dem von ErbB3-/- Tieren verglichen. Dazu wurden in situ Hybridisierung mit Sox10 Probe und histologische Analysen durchgeführt. Sox10 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine „high-mobility-group“ Box enthält und stark in Schwann'schen Zellen exprimiert wird. Dabei wurden Sox10 positive Vorläufer von Schwann'schen Zellen entlang aller peripheren Axone in den Kontrollembrionen (E12.5) beobachtet (Abb. 7a). Zusätzlich wird Sox10 von Satelliten-Zellen im Ganglion exprimiert. Vorläufer von Schwann'schen Zellen entlang der peripheren Axone waren in geretteten ErbB2 oder in ErbB3 Mutanten nicht vorhanden (Abb. 7b und c). Allerdings waren Sox10 positive Zellen in den Spinalganglien vorhanden; diese entsprechen den Satellitenzell-Vorläufern. Das Fehlen von Schwann'schen Zellen bei den geretteten ErbB2 und ErbB3 Mutanten wurde auch am Tag E15.5 beobachtet, z.B. in präparierten Brustkörben, an denen eine in situ Hybridisierung mit Sox10 durchgeführt worden war (Abb. 7e und f). Im Gegensatz dazu waren solche Zellen entlang der Interkostalnerven des Brustkorbes in Kontrolltieren gut nachweisbar (Abb. 7d).

Histologische Untersuchungen an Semidünn-Schnitten durch den Plexus brachialis zeigten, daß die Axonenbündel der Kontrolltiere (E15,5) mit Kernen von Vorläufern von Schwann'schen Zellen gefüllt sind (Abb. 7g). Zusätzlich sind die Nerven von einer definierten Zellschicht, dem sich entwickelnden Perineurium, umgeben. In den geretteten ErbB2 sowie die ErbB3 Mutanten waren nur sehr wenige Kerne vorhanden (Pfeilspitze in Abb. 7i). Die Nerven, deren Durchmesser relativ gering war, bestanden nur aus Axonenbündeln, die ebenfalls von dem sich entwickelnden Perineurium umgeben (Abb. 7h und i) waren.

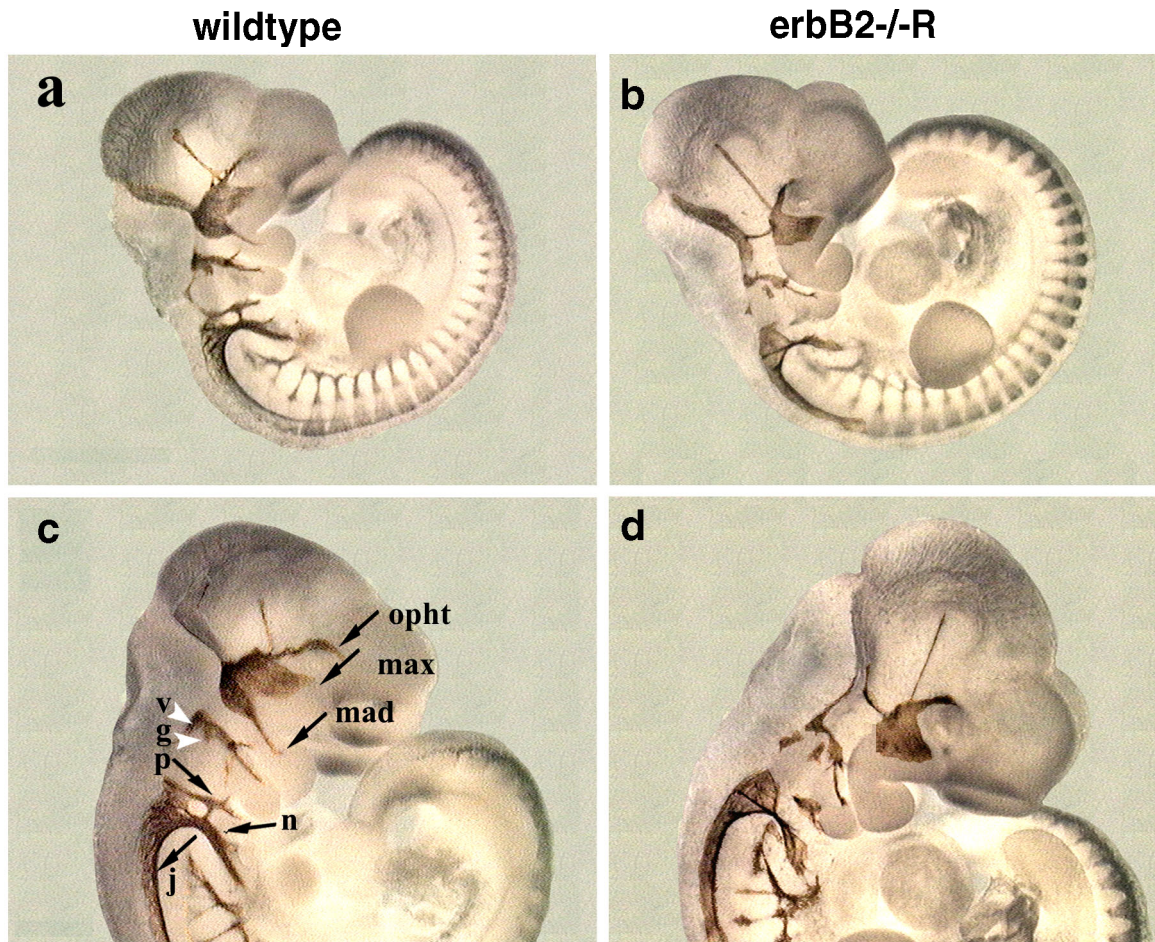
3.6 ErbB2 im peripheren Nervensystem

3.6.1 Frühe Defekte in den sensorischen Ganglien und Nerven

Die Entwicklung der sensorischen Kranialganglien, die aus den ektodermalen Plakoden und Neuralleistenzellen entstehen, wurde immunohistochemisch untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, daß am E10,5 der Embryonalentwicklung die verschiedenen Ganglien und ihre Projektionen bei den ErbB2-/-R Embryonen unterschiedlich betroffen sind (Abb. 8). Wie bei den Null-Mutanten von NRG-1 und ErbB2 fehlte bei den geretteten ErbB2-/- der dorsomediale Teil des Ganglion trigeminale und seine mandibulare Projektion. Im Vergleich zu den Wildtypembryonen war die maxillare Projektion verkürzt. Das Ganglion superius (der proximale Teil des IX. Kranialganglions) und zentrale Projektionen vom Petrosal-Ganglion waren nicht vorhanden. Dagegen zeigte das Jugular-Ganglion keine größere Veränderung. Das Nodosal-Ganglion ist kleiner und seine peripheren Projektionen sind defaszikulierte. Dagegen waren die aus dem Genikuli-Ganglion austretenden peripheren Projektionen normal in der Länge, aber defaszikulierte. Im Gegensatz zu den Kranialganglien war die Größe der Spinalganglien am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung in den ErbB2-/-R Embryonen normal.

Abbildung 8: Defekte in den Kranialganglien und -nerven der ErbB2-/-R Embryonen.

Immunohistochemische Färbung der Ganglien und Nerven von Wildtyp (a, c) und ErbB2-/-R (b, d) Embryonen mit dem anti-L1 Antikörper am E10,5. Die Abkürzungen für die angezeigten Kranialganglien stehen für: Vestibulocochlearis- (v), Genikuli- (g), Petrosal- (p), Nodosal- (n), und Jugular- Ganglion (j). Die peripheren Äste des N. trigeminus sind als „opht“ (N. ophthalmicus), „mad“ (N. mandibularis) und „max“ (N. maxillaris) gezeigt.



3.6.2 Veränderte axonale Morphologie und Degeneration sensorischer Neuronen in späten Stadien

Durch Immunohistochemie wurde die Morphologie von sensorischen Nerven der Haut in späteren Stadien untersucht. Im Vergleich zu den Kontrolltieren waren diese Nerven in geretteten ErbB2 mutanten Tieren defaszikulierte und dünn. Die Defaszikulierung der Nerven war sowohl distal als auch proximal ausgeprägt (Abb. 9d). Histologische Analysen zeigten, daß die Spinalganglien in geretteten ErbB2 mutanten Tieren in späten Entwicklungsstadien sehr klein waren (z.B. E18.5; Abb. 9f).

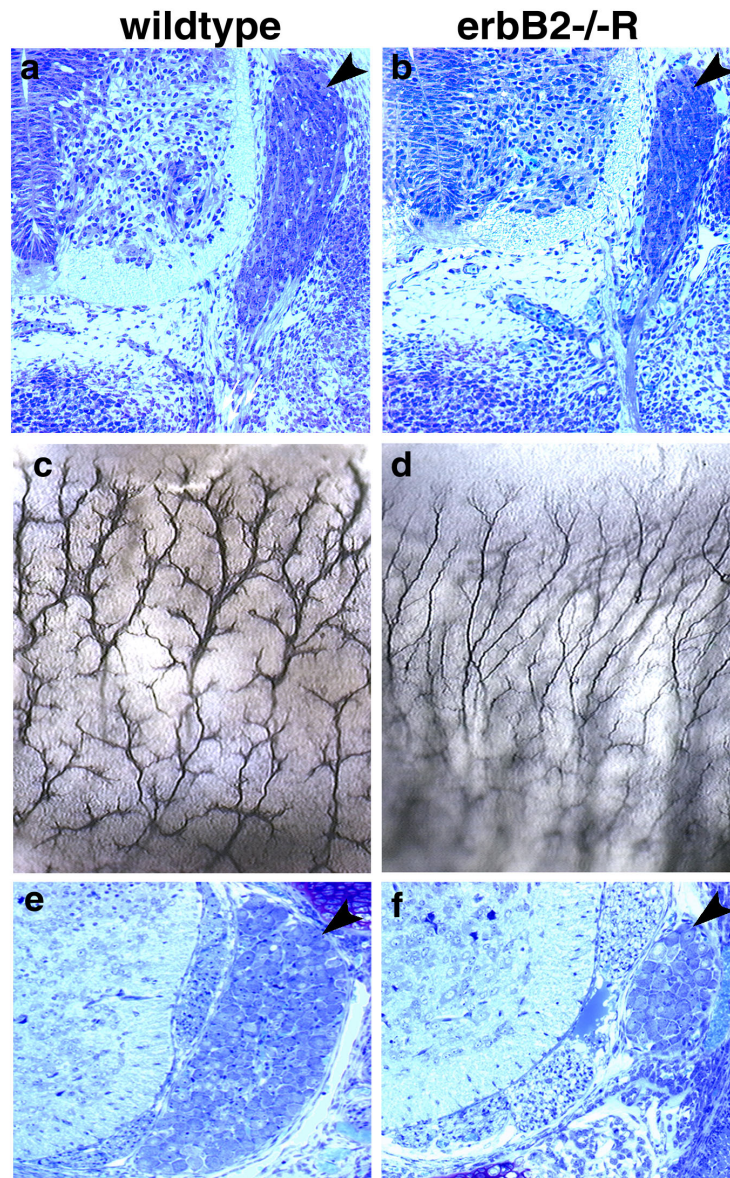


Abbildung 9: Morphologie der Spinalganglien und -nerven der geretteten ErbB2-/- Embryonen.

Toludin-Blau-Färbung der Spinalganglien von Wildtyp (a, e) und ErbB2-/-R (b, f) Embryonen. Am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung ist die Größe der Spinalganglien von den geretteten ErbB2-/- (b) mit der von Wildtypembryonen (a) vergleichbar. Die Pfeilspitzen zeigen zu den Spinalganglien und die Pfeile zu den Vorläufern der Schwann'schen Zellen, die mit den peripheren Nerven assoziiert vorkommen. Im Vergleich zu den Wildtypembryonen kommen in den peripheren Projektionen von ErbB2-/-R Embryonen kaum Vorläufer der Schwann'schen Zellen vor. Im Vergleich zu den Wildtypembryonen zeigen die Spinalganglien von ErbB2-/-R Embryonen am E18,5 eine Verkleinerung ihrer Größe, die durch erhöhtes Absterben von sensorischen Neuronen verursacht wurde. Die Abbildungen (c) und (d) zeigen die sensorischen Projektionen der Haut, die durch Whole Mount Immunohistochemie mit L1 Antikörper gefärbt wurden. Im Vergleich zu den Kontrollembryonen zeigen die sensorischen Projektionen der geretteten ErbB2-/- Embryonen eine erhöhte Defaszikulierung und Desorganisation ihrer Axone.

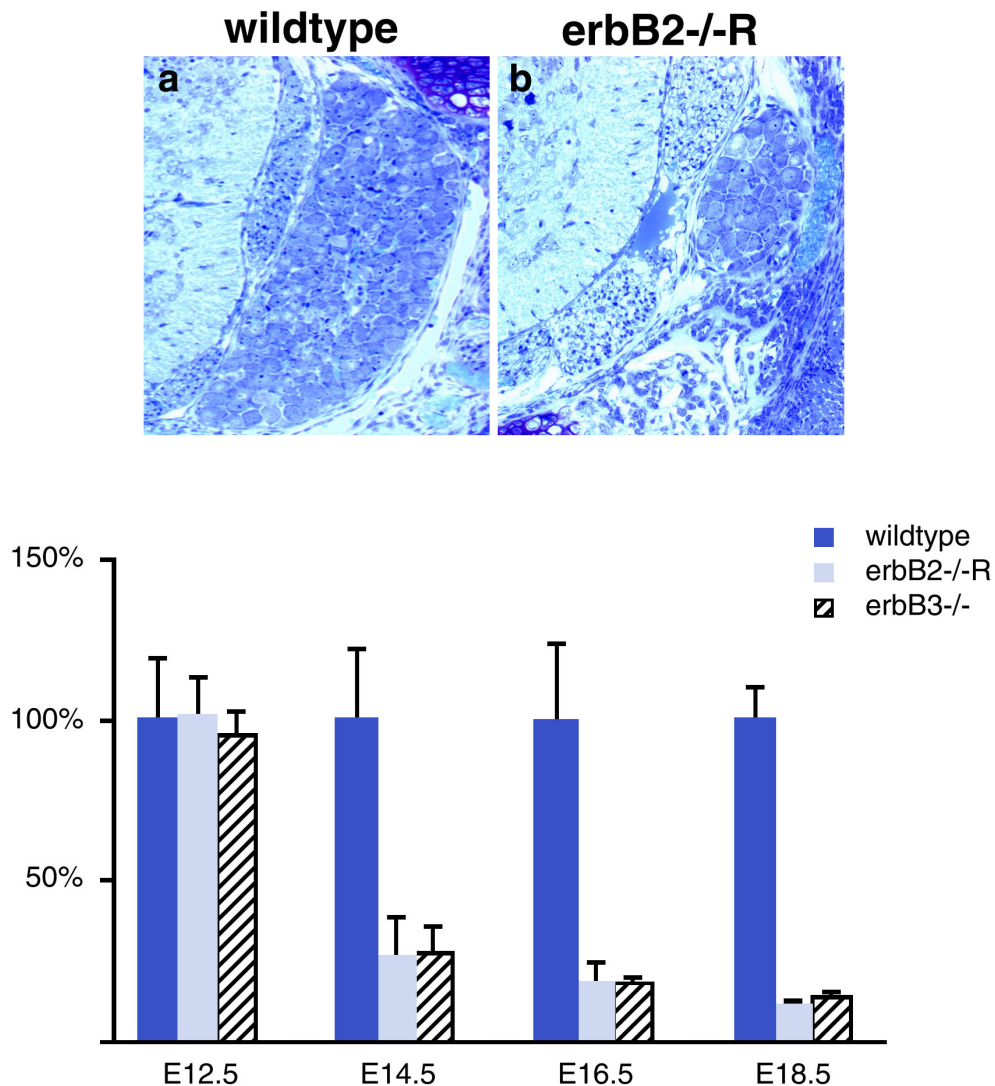


Abbildung 10: Morphologie und Degeneration von sensorischen Neuronen.

Nach der Färbung mit Toluidin-Blau wurden die sensorischen Neuronen der Spinalganglien von Wildtyp (a), ErbB2-/-R (b) und ErbB3-/- Embryonen gezählt. Die graphische Darstellung zeigt die Anzahl der Zellen in den Spinalganglien (E12,5) sowie die Anzahl der Neuronen (E14,4; E16,5 und E18,5), die bei den ErbB2-/-R sowie ErbB3-/- Embryonen gezählt wurden. Die durchschnittliche Summe der bei den Wildtypembryonen in L4 und L5 gezählten Zellen (E12,5) und Neuronen (E14,5-E18,5) wurden auf 100% gesetzt und mit der Anzahl in den ErbB2-/-R und ErbB3-/- Embryonen verglichen.

Die Anzahl der sensorischen Neuronen wurde am E12,5; E14,5; E16,5 und E18,5 durch Zählung bestimmt. Dafür wurden L4 und L5 (Lumbal 4 und 5) Spinalganglien von geretteten ErbB2 sowie ErbB3-/- und Kontrollembryonen (jeweils 3-4 Tiere) präpariert, eingebettet und aus ihnen Semi-Dünnschnitte hergestellt. Die

durchschnittliche Anzahl der gezählten sensorischen Neuronen in Wildtyp-Tieren wurde als 100% definiert und mit der Anzahl in den mutanten Tieren verglichen. Am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung war die Anzahl von Neuronen in allen drei Genotypen vergleichbar. Am Tag 14,5 wurde ein 72%iger Verlust von sensorischen Neuronen in den geretteten ErbB2 und den ErbB3 mutanten Tieren beobachtet. Der Verlust von sensorischen Neuronen nahm in späteren Entwicklungsstadien in beiden Mutanten weiter zu und betrug etwa 80% am Tag 16,5 und 88% am Tag 18,5 der Embryonalentwicklung (Abb. 10).

3.6.3 Defaszikulierung von Motoneuronen und deren segmentspezifische Degeneration

Ich untersuchte ebenfalls Interkostalnerven mit Immunofluoreszenz am Tag 15,5 der Embryonalentwicklung. In diesem Stadium sind die meisten sensorischen Neuronen in geretteten ErbB2 und in ErbB3 mutanten Tieren degeneriert. Deshalb sollte der größte Anteil der sichtbaren Nerven den Projektionen von Motoneuronen entsprechen. Die immunhistologischen Untersuchungen zeigten, daß Interkostalnerven in den mutanten Tieren ebenfalls stark defaszikuliert waren. Die proximalen Interkostalnerven sind in mehrere Axonenbündel aufgeteilt, die parallel nebeneinander laufen (Abb. 11b und c). Die seitlichen Nervenzweige, die in regelmäßigen Abständen von den Hauptästen abzweigten, waren ebenfalls defaszikuliert (Abb. 11b und c). Untersuchungen in distalen Interkostalnerven am Tag 15,5 (Abb. 11e und f) und 18,5 (Abb. 14b und c) der Embryonalentwicklung zeigten erhöhte Defaszikulierung und Desorganisation.

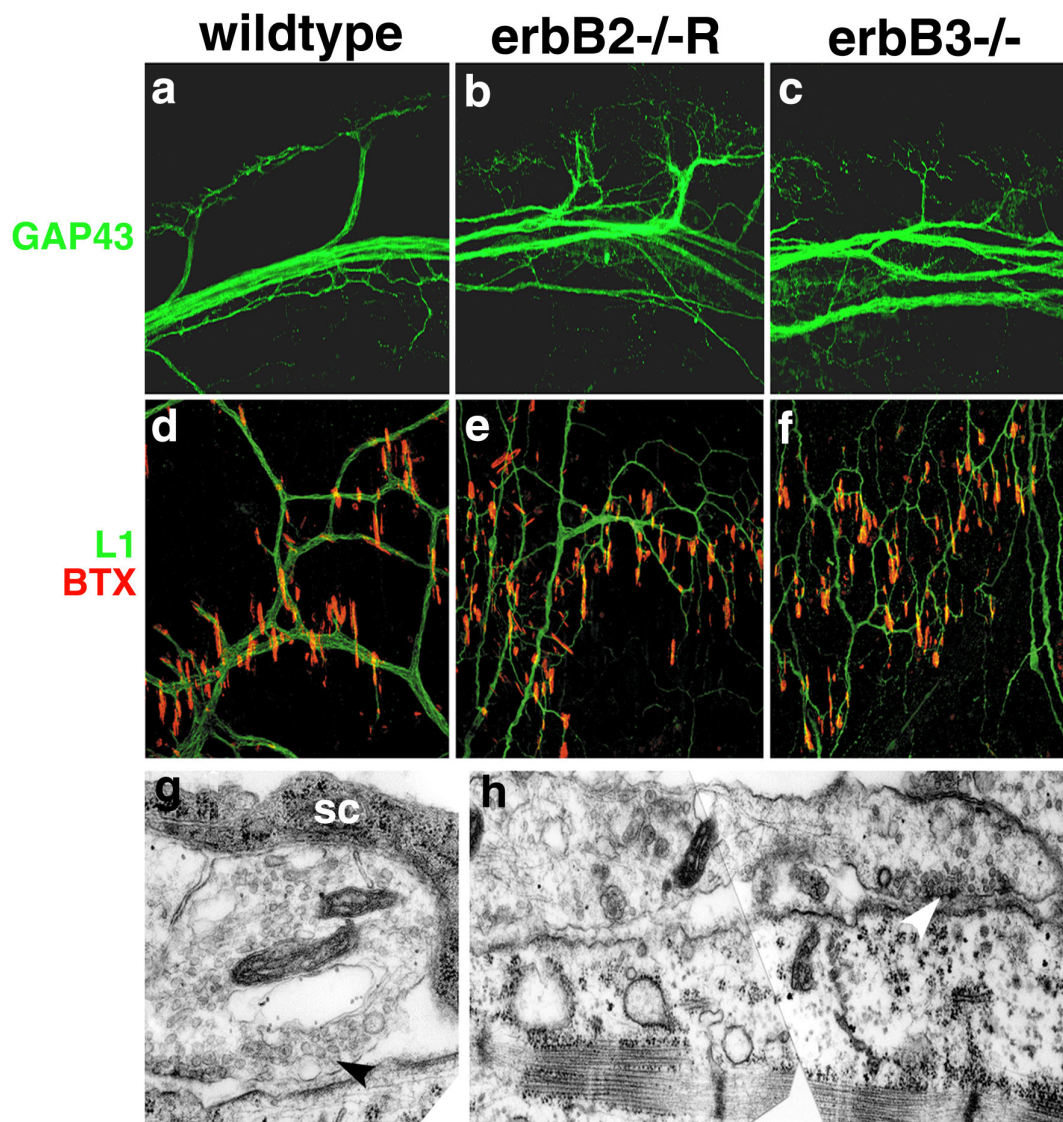


Abbildung 11: Morphologie der Axone von Motoneuronen am E15,5.

Immunofluoreszenzfärbung des proximalen Teils der fünften Interkostalnerven von Wt (a), ErbB2-/-R (b) und ErbB3-/- (c) Embryonen mit anti-GAP43 Antikörper am E15,5 der Embryonalentwicklung. Die Projektionen der motorischen Neuronen und ihre Seitenverzweigungen zeigen bei den mutanten Embryonen eine erhöhte Defaszikulierung und Desorganisation. Die Abbildungen (d) bis (f) zeigen die distalen Projektionen der elften Interkostalnerven ebenfalls von E15,5 Embryonen, die mit anti-GAP43 Antikörper und Rhodamin-gekoppeltem α -Bungarotoxin gefärbt sind. Die Axone zeigen Defaszikulierung, und die Nervenendigungen weisen eine erhöhte Ansammlung von AChR auf. Im Vergleich zu den Wildtypembryonen (g) zeigt die ultrastrukturelle Analyse der neuromuskulären Synapsen der geretteten ErbB2-/-R Embryonen (h) abnorm verlängerte Kontaktstellen zur postsynaptischen Muskelregion. Terminale Schwann'sche Zellen sind bei den geretteten Embryonen nicht vorhanden (h). Die Pfeilspitzen zeigen auf die synaptischen Vesikel. Die Abkürzung „sc“ steht für die Schwann'schen Zellen.

Ähnliche Untersuchungen des N. phrenicus am Tag 14.5 der Embryonalentwicklung mit anti GAP 43 Antikörper zeigten, daß der Nerv stark defaszikuliert

und zum Teil degeneriert war (Abb. 12b). Am 15,5 der Embryonalentwicklung waren die meisten Axone und Nervenendigungen degeneriert, und in späteren Stadien erfolgte eine vollständige Retraktion und Degeneration des Nerven (Abb. 12d). Aufgrund des Bewegungs- und Atmungsdefektes der geretteten mutanten Embryonen wurden die somatischen Motoneuronen näher untersucht. Motoneuronen können zwar histologisch lokalisiert werden, aber es ist sehr schwierig, sie im Rückenmark eindeutig von anderen Neuronen zu unterscheiden. Um Motoneuronen eindeutig zu identifizieren, wurde eine in situ Hybridisierung mit VACHT (vesicular acetylcholin transporter) durchgeführt. Dieses Gen wird im ventralen Rückenmark nur von Motoneuronen exprimiert. Nach Hybridisierung wurden die Rückenmarksgewebspräparate geschnitten und gezählt (Abb. 13). Gezählt wurden Motoneuronen in Zervikal-, Thorakal- und Lumbal-Segmenten, da meine immunohistologischen Untersuchungen darauf hinwiesen, daß nur bestimmte Nerven stark beeinträchtigt waren.

Die Zählung am E15,5 der Embryonalentwicklung ergab im Vergleich zu den Kontrolltieren einen 35%igen Verlust an Motoneuronen im zervikalen Rückenmark der geretteten ErbB2 mutanten Embryonen. Der Verlust von Motoneuronen im zervikalen Rückenmark war bei den ErbB3 mutanten Embryonen ähnlich. Im thorakalen und lumbalen Rückenmark wurde zu diesem Zeitpunkt kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei Genotypen festgestellt (Abb. 13c).

Am Tag 18,5 der Embryonalentwicklung wurde bei den geretteten ErbB2 mutanten Tieren ein Verlust von 79% der Motoneuronen im zervikalen und 58% im lumbalen Rückenmark beobachtet (Abb. 13d). Der Unterschied in thorakalen Segmenten war dagegen gering. Ähnliche Verluste wurden in den ErbB3 mutanten Tieren festgestellt.

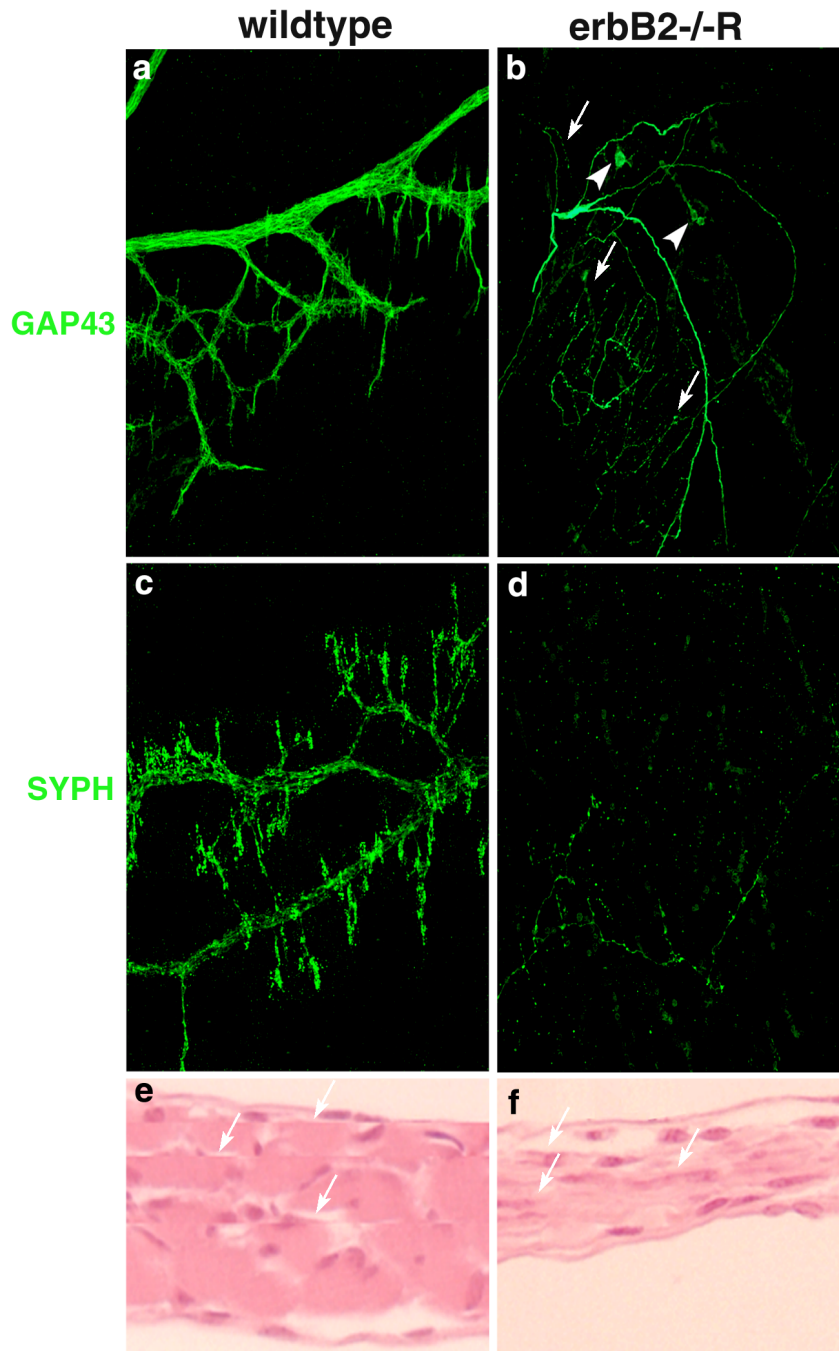


Abbildung 12: Degeneration des N. phrenicus und Defekte im Zwerchfell der ErbB2-/-R Embryonen.

Die Abbildung zeigt Immunofluoreszenzfärbung des N. phrenicus von Wildtyp (a) und ErbB2-/-R (b) Embryonen mit dem anti GAP43 Antikörper am E14,5 und mit Synaptophysin am E15,5. Im Vergleich zu den Wildtypembryonen ist der N. phrenicus bei den ErbB2-/-R Embryonen stark defasziuliert und desorganisiert. Am Tag 15,5 der Embryonalentwicklung sind nur noch sehr wenige Nerven und Nervenendigungen vorhanden(d). Retraktionsknoten und degenerierende Axone sind angezeigt(b). Das Zwerchfell bei den geretteten ErbB2-/- Embryonen (f) ist dünner als bei den Kontroll-embryonen (e).

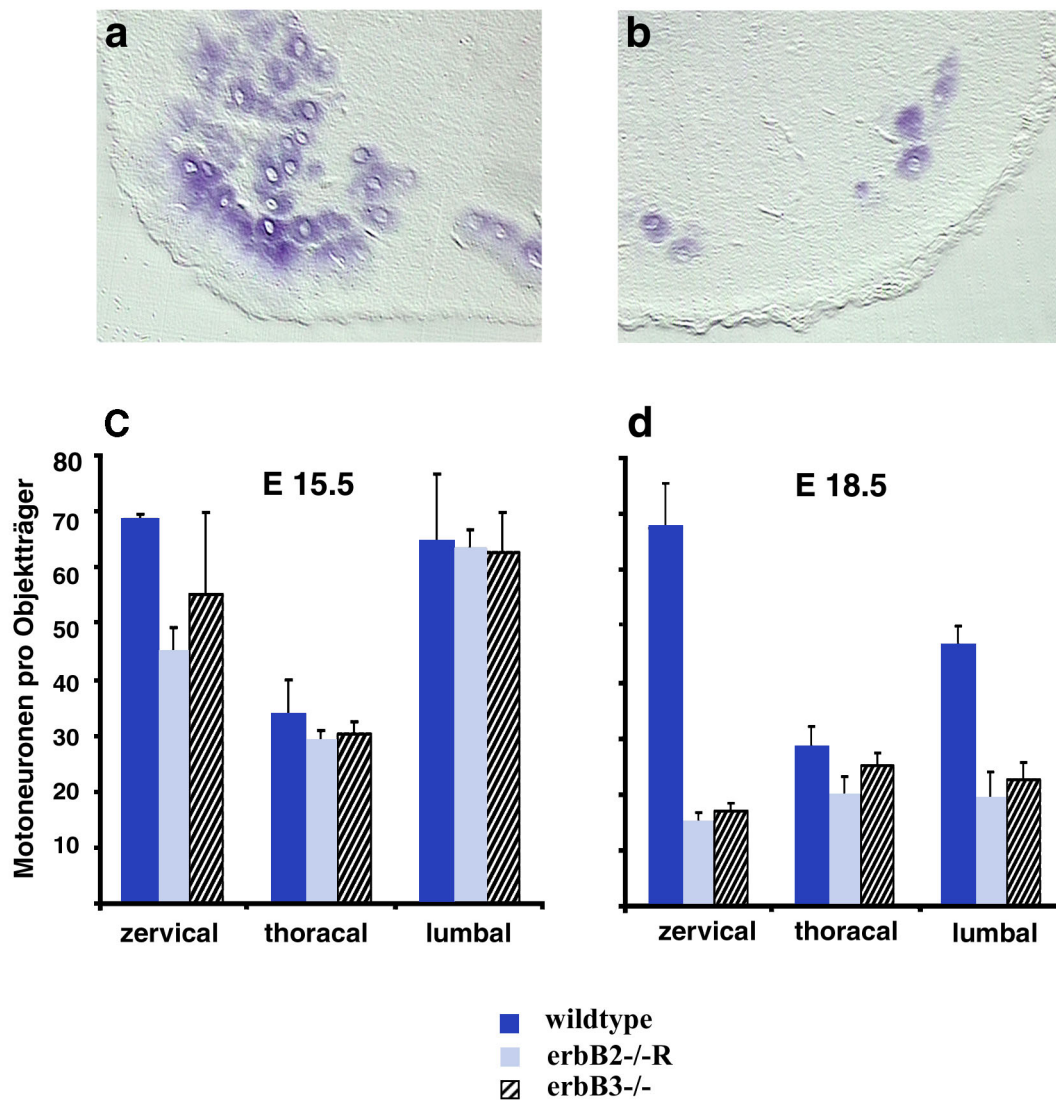


Abbildung 13: Degeneration von motorischen Neuronen in den zervikalen, thorakalen und lumbalen Segmenten des Rückenmarkes.

Nach in situ Hybridisierung mit der VACHT (vesicular acetylcholin transporter) spezifischen Probe wurden die Motoneuronen in den geschnittenen Gewebepreparaten der zervikalen, thorakalen und lumbalen Segmente von den Kontroll-embryonen (a) und den ErbB2-/-R (b) sowie ErbB3-/- Embryonen gezählt. Die durchschnittlichen Werte der pro Objektträger durchgeführten Zählungen am E15,5 (c) und E18,5 (d) sind gezeigt (n = 3-4 Embryonen).

3.6.4 Abnormalitäten an neuromuskulären Endplatten

Die Entwicklung der neuromuskulären Synapsen setzt eine wechselseitige Interaktion zwischen Motoneuronen, terminalen Schwann'schen Zellen und Muskelfasern voraus. Diese Entwicklung wurde bei den geretteten ErbB2-/- Mutanten und ErbB3-/- Embryonen, die keine Schwann'schen Zellen besaßen sowie schwerwiegend defaszikulierte Motoneuronen aufwiesen, untersucht. Die Färbung des AChR mit dem Rhodamin-gekoppelten α -Bungarotoxin zeigte Veränderungen der Morphologie der Synapsen in geretteten ErbB2-/- und ErbB3-/- Tieren. α -Bungarotoxin ist ein Schlangengift, das mit hoher Affinität an den AChR bindet. In den mutanten Tieren waren die Synapsen abnorm verteilt (Abb. 14e und f). Als Folge der Defaszikulierung von Motoneuronen in den mutanten Tieren waren oft mehrere AChR Aggregate zu beobachten, anstelle eines einzelnen Aggregates an den Nervenendigungen. Die zusätzlichen Verzweigungen der Nerven endeten in gesonderten Synapsen (Pfeilspitzen in Abb. 14e und f). Ein Teil der AChR Aggregate war in den mutanten Tieren vergrößert. Durch die Degeneration von Nervenendigungen oder der Axone wurden weiterhin AChR Aggregate beobachtet, die ihren Kontakt zu den Nerven verloren hatten. In mutanten Tieren waren diese Aggregate auch ohne Nervenendigung zu beobachten. Dies war besonders auffällig im Zwerchfell und wahrscheinlich auf eine Retraktion des N. phrenicus zurückzuführen, der aus verschiedenen Zervikalsegmenten (C3-C5) des Rückenmarks stammt.

In Kooperation mit P. Caroni wurden die Synapsen im Elektronenmikroskop untersucht. Dabei wurden vergrößerte Kontaktstellen zwischen Nervenendigungen und Muskelfasern beobachtet (Abb. 11h). In den verlängerten Kontaktstellen wurde oft eine erhöhte Ansammlung von synaptischen Vesikeln nachgewiesen. Doppelfärbung mit S100-Antikörper und Rhodamin-gekoppeltem α -Bungarotoxin zeigte das Fehlen von terminalen Schwann'schen Zellen an den Synapsen. Im Gegensatz dazu wurde eine Ko-Lokalisation von S100-positiven Schwann'schen Zellen und den AChR Aggregaten in den Kontrollembryonen festgestellt (Abb. 14g).

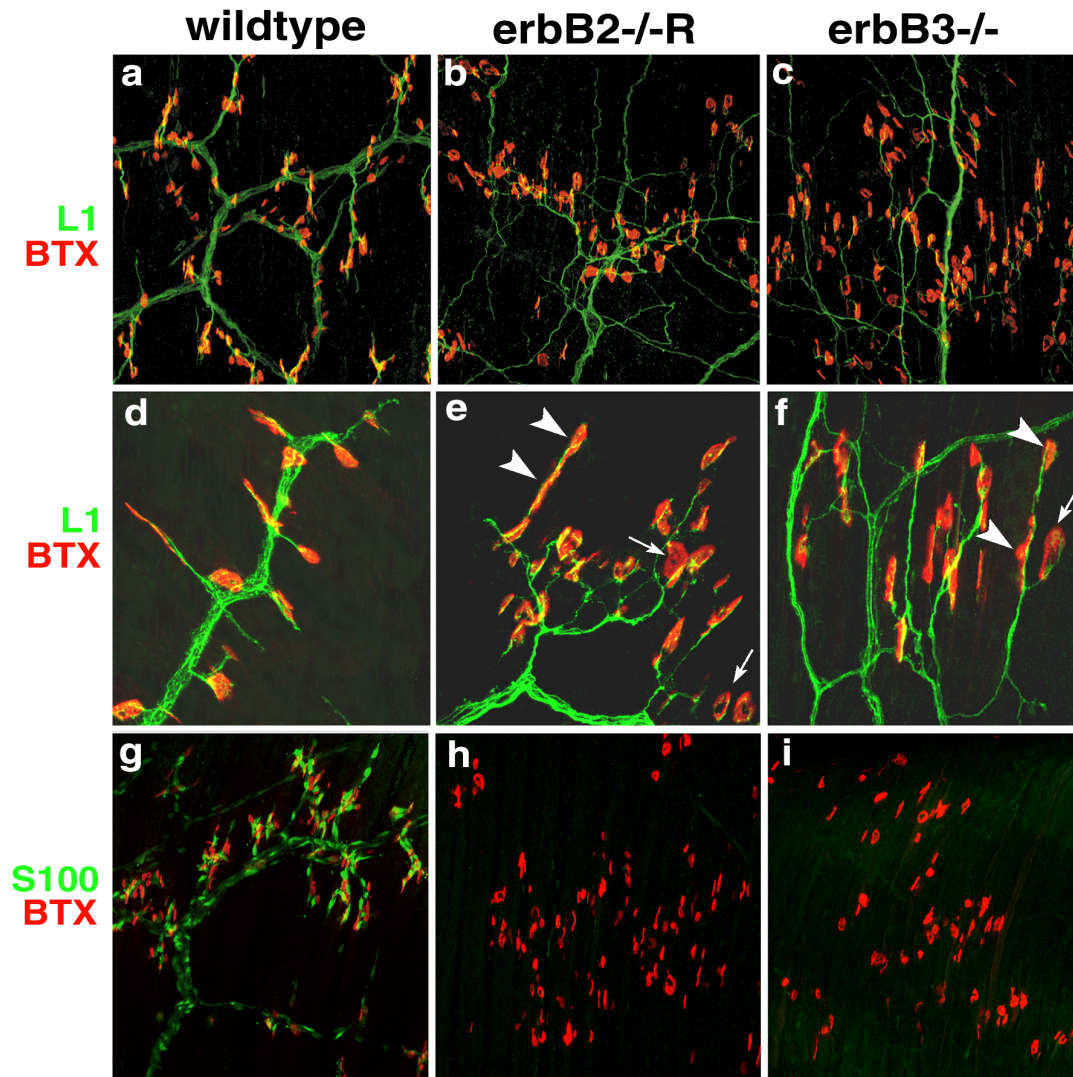


Abbildung 14: Morphologie der Axone von Motoneuronen, die Verteilung der neuromuskulären Synapsen und die Abwesenheit von terminalen Schwann'schen Zellen am E18,5.

Immunofluoreszenzfärbung der elften Interkostalnerven von Wt (a, d) ErbB2-/-R (b, e) und ErbB3-/- (c, f) mit anti-L1 Antikörper am E18,5. Die Pfeile und Pfeilspitzen weisen auf die abnormen Synapsen hin. Die Abbildungen in (g) für Wt, (h) für ErbB2-/-R und (i) für ErbB3-/- Embryonen zeigen die Immunofluoreszenzfärbung mit anti-S100 Antikörper (grüne Färbung bei den Schwann'schen Zellen und rote Färbung durch Rhodamin gekoppeltes α -Bungarotoxin bei AChR).

Die postsynaptische Genexpression von cAMP-abhängiger Proteinkinase A (RI-PKA), α -AChR sowie ϵ -AChR wurde im Zwerchfell und in Interkostalmuskeln am E18,5 der Embryonalentwicklung durch in situ Hybridisierung analysiert. Postsynaptische Expression für alle diese Gene wurde in den mutanten Tieren (ErbB2-/- R und ErbB3-/-) beobachtet. Im proximalen Bereich der Interkostalmuskeln war die Expression in den mutanten Tieren geringfügig niedriger als in den Kontrolltieren (z.B. die Expression von RI-PKA, Abb. 15b und c). Das Band der Kerne, die postsynaptische Gene exprimierten, war breiter (Pfeilspitzen in Abb. 15e und f). Es wurden sogar einzelne Muskelfasern, die postsynaptisch regulierte Gene in allen Kernen exprimierten, beobachtet. Trotz der Abwesenheit des Nervus phrenicus wurde am E18.5 bei beiden mutanten Embryonen im Zwerchfell-Muskel ein Band von Kernen, die postsynaptisch-regulierte Gene exprimierten, beobachtet. Im Vergleich zu den Kontrolltieren war das Signal allerdings deutlich schwächer (Abb. 15h und i). Die Expression von ϵ -AChR im Zwerchfell-Muskel der geretteten ErbB2 und ErbB3 mutanten Tiere war mit dem der Kontrolltiere vergleichbar (Abb. 15j-l).

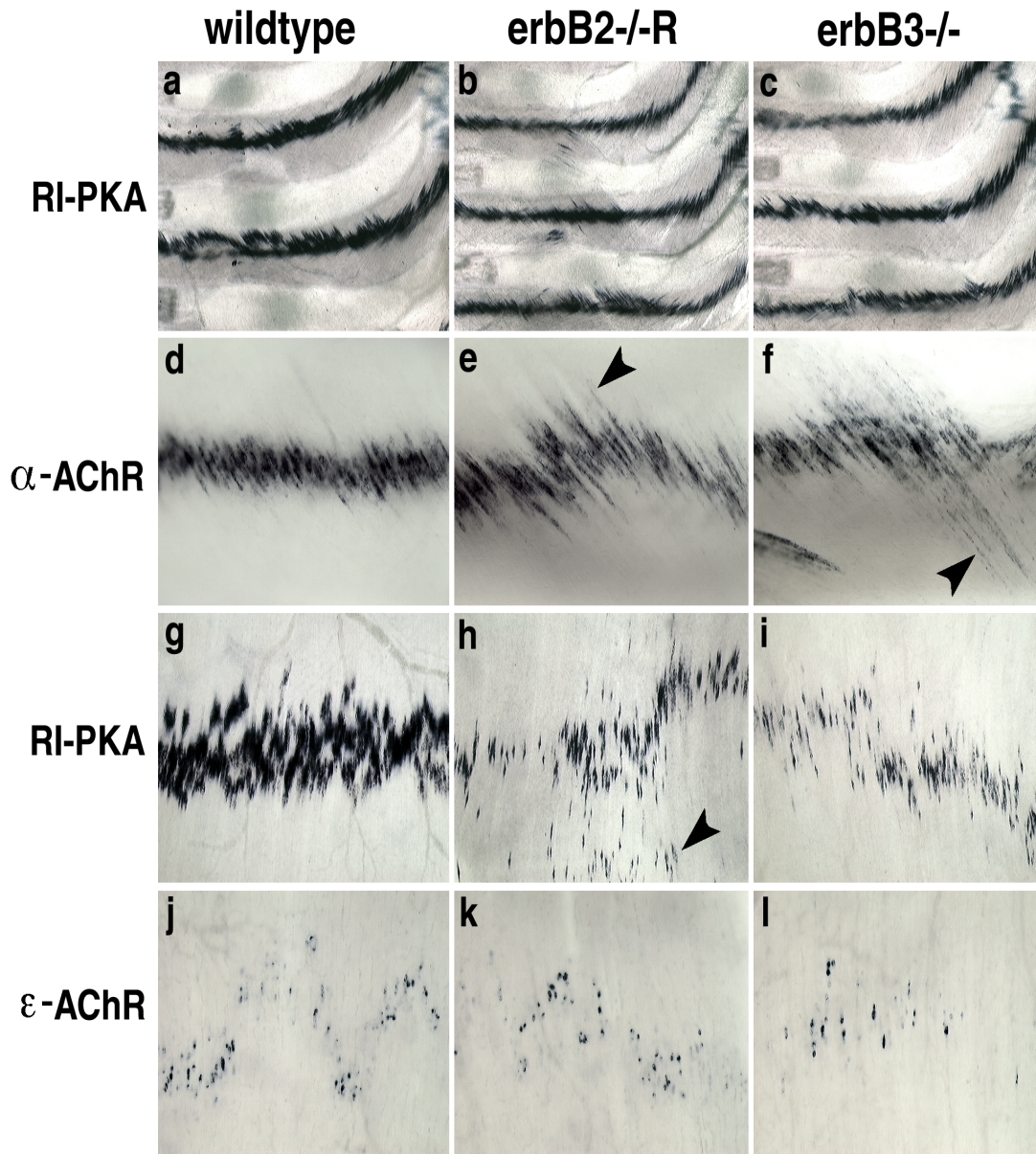


Abbildung 15: Postsynaptische Genexpression bei den ErbB2^{-/-}R und ErbB3^{-/-} Embryonen am E18,5 der Embryonalentwicklung.

Die postsynaptische Genexpression in den Interkostalmuskeln (a-f) und im Diaphragma (g-l) wurde durch Whole Mount in situ Hybridisierung mit den Proben RI-PKA (a-c und g-i), α -AChR (d-f) und ϵ -AChR (j-l) durchgeführt. Die Pfeilspitzen (e, f) zeigen zu den Muskelfasern, bei denen keine postsynaptisch begrenzte Expression stattfindet. Muskelzellkerne, die von dem Hauptzweig des N. phrenicus entfernt liegen, sind in (h) gezeigt.

4 Diskussion

ErbB2 spielt eine wichtige Rolle als Korezeptor bei der Signaltransduktion von Neuregulinen. Dies wurde durch biochemische und zellbiologische Untersuchungen *in vitro* sowie durch genetische Untersuchungen in der Maus gezeigt. Die genetische Untersuchung des ErbB2 Rezeptors war durch die frühe embryonale Letalität von ErbB2 mutanten Embryonen limitiert. Die herzspezifische Expression von ErbB2 cDNA in einem ErbB2^{-/-} genetischen Hintergrund erlaubte das Überleben der Embryonen und schuf die Möglichkeit, seine späteren Korezeptor-Funktionen zu untersuchen. Alle Phänotypen, die bisher in Neuregulin-1 oder Isoform-spezifischen Mutationen von Neuregulin-1 Tieren beobachtet wurden, waren in ErbB2 mutanten oder den geretteten ErbB2^{-/-} Tieren vorhanden. Dies zeigt, daß ErbB2 essentiell für die Übermittlung von NRG1-Signalen ist, obwohl der Rezeptor NRG1 nicht direkt bindet. Die Summe der ErbB3 und ErbB4 Phänotypen ergibt den ErbB2 Phänotyp; ErbB2 funktioniert also als Korezeptor für die ErbB3 und ErbB4 Rezeptoren.

Das für die normale Entwicklung der Rumpf- und Kranial-Neuralleistenzellen benötigte NRG-Signal wird durch ErbB2 und ErbB3 vermittelt. Die morphogenetische Differenzierung von ventrikulären Trabekeln im Herzen erfordert dagegen die aus ErbB2 und ErbB4 bestehenden Rezeptor-Heteromere, die das Neuregulin-Signal weiterleiten. Somit bestehen *in vivo* die funktionellen Rezeptor-Heteromere, die bei der Vermittlung des Neuregulin-Signals beteiligt sind, aus ErbB2/ErbB3 und ErbB2/ErbB4 Rezeptorpaaren (Gassmann et al. 1995; Lee et al. 1995; Meyer und Birchmeier 1995; Riethmacher et al. 1997). In allen Fällen erfolgt die Übermittlung des Neuregulin-Signals auf parakrine Weise, wobei sich die Zellen, die die Liganden und die Rezeptoren exprimieren, in Nachbarschaft befinden. Dementsprechend sind durch die Null-Mutation von NRG1, ErbB2 und ErbB4 nur diejenigen Zellen früh in der Embryonalentwicklung betroffen, die die Rezeptoren exprimieren. Während späterer Phasen der Entwicklung können in den

geretteten ErbB2^{-/-} oder in ErbB3^{-/-} Tieren auch indirekte Mechanismen zu Entwicklungsdefiziten führen.

4.1 Der ErbB Rezeptor und die Entwicklung von Schwann'schen Zellen

In ErbB2^{-/-}-R Tieren sind kaum Vorläufer von Schwann'schen Zellen entlang der Axone der Spinalnerven vorhanden. In den Spinalganglien bilden sich allerdings spezielle Gliazellen, die Satellitenzellen. Sensorische und motorische Neuronen exprimieren NRG1, und zwar die Typ III Isoform, die in ihre axonale Membran eingebaut wird. Dieses axonale Signal ermöglicht die normale Entwicklung der Vorläufer von Schwann'schen Zellen, die ErbB2 und ErbB3 exprimieren und entlang der Axone lokalisiert sind.

Dieser Signaltransduktionsweg wird schon früh in der Entwicklung von Schwann'schen Zellen benötigt. Embryonen mit Null-Mutation im NRG1 Gen zeigten am Tag 10,5 der Entwicklung deutlich weniger Vorläufer von Schwann'schen Zellen (Meyer et al. 1997). In diesem Entwicklungsstadium exprimieren die Vorläufer der Schwann'schen Zellen noch Marker für Neuralleistenzellen (z.B. Sox10, ErbB3), aber keine Gene die typischerweise in Gliazellen exprimiert werden (z.B. S100). Untersuchungen über die Determinierung des Zellschicksals in Hühnchen zeigen, daß Gliazellen, die mit Axonen der peripheren Projektionen assoziieren und Gliazellen in den Spinalganglien aus den gleichen Neuralleistenzellen stammen (Frank und Sanes 1991). Ob die peripheren Schwann'schen Zellen aus den Glia-Vorläufern in den Spinalganglien hervorgehen, oder ob Neuralleistenzellen direkt zu den Axonen wandern, ist unklar. Die Funktion des Neuregulin-Signalweges in der frühen Phase könnte darauf abzielen, den Vorläuferzellen die Wanderung entlang der Axone zu ermöglichen.

Die wenigen Vorläufer, die entlang der Axone gefunden wurden, proliferierten nicht, und in den späten Stadien (z.B. E12,5 oder E15,5) konnte ich in den

geretteten ErbB2-/- Tieren praktisch keine Schwann'schen Zellen mehr beobachten. Diese Resultate zeigen, daß sowohl Neuralleisten-Vorläufer der Schwann'schen Zellen als auch die unreifen Schwann'schen Zellen während der pränatalen Entwicklung das Neuregulin Signaltransduktionssystem benötigen.

Das in den Vorläufern der Schwann'schen Zellen durch ErbB2 und ErbB3 empfangene NRG1 Signal scheint die Typ III Isoform zu repräsentieren (Kramer et al. 1996; Bermingham McDonogh et al. 1997; Meyer et al. 1997). Wie bei den geretteten ErbB2-/- Tieren fehlen auch in Tieren mit einer Mutation in der Typ III Isoform Schwann'sche Zellen entlang der peripheren Projektionen der Spinalnerven (Wolpowitz et al. 2000). Der Phänotyp, der in diesen Tieren beobachtet wurde, ist zwar ähnlich, aber eindeutig schwächer ausgeprägt. In solchen Tieren werden nämlich an Axonen in unmittelbarer Nähe der Spinalganglien auch noch in späten Stadien Schwann'sche Zellen beobachtet, während sie in peripheren Nerven ebenfalls fehlen. Die mildere Ausprägung des Phänotyps könnte dadurch erklärt werden, daß in den Ganglien auch noch andere NRG1 Isoformen oder andere Neureguline (NRG2 oder NRG3) exprimiert werden. In diesen Mutanten könnten Schwann'sche Zellen in der Nähe der Ganglien also diffundierbare Neuregulin-Signale noch empfangen, während das axonale Signal, das durch die Typ III Isoform von NRG1 gegeben wird, fehlt.

Aufgrund von Zellkultur-Untersuchungen wird eine instruktive Rolle von NRG1 in der Differenzierung von Neuralleistenzellen zu Schwann'schen Zellen diskutiert (Shah et al. 1994). In Neuralleistenzell-Kulturen, die ohne NRG1 kultiviert wurden, bildeten 83,6% \pm 3,7% der Kolonien Neuronen. In Anwesenheit des Faktors betrug der Anteil der Kolonien, die Nervenzellen bildeten, nur noch 1,8 % \pm 2,6 %. Obwohl diese experimentellen Daten eine Wirkung von NRG1 bei der Differenzierung von Neuralleistenzellen zu Gliazellen zeigen, können in den geretteten ErbB2-/- oder ErbB3-/- Embryonen Gliazellen (d.h. Satellitenzellen) gebildet werden, und die Anzahl der sensorischen Nervenzellen ist nicht verändert.

Zum Beispiel ist am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung die Anzahl von sensorischen Nervenzellen in den Spinalganglien der geretteten ErbB2^{-/-} und ErbB3^{-/-} Tiere mit denen der Kontrolltiere vergleichbar.

4.2 Neuregulin und die Entwicklung von neurogenen Neuralleistenzellen

Wie bei den NRG1 und ErbB2 Null-Mutanten zeigen auch die geretteten ErbB2^{-/-} Embryonen Defekte bei der Entwicklung der Kranialganglien am E10,5 (Lee et al. 1995; Meyer und Birchmeier 1995; Erickson et al. 1997). Die Kranialganglien werden aus den ektodermalen Plakoden und aus den Neuralleistenzellen gebildet. Die Teile der Ganglien, die durch Mutation des ErbB2 Gens betroffen sind, werden von den Neuralleistenzellen gebildet. Zum Beispiel fehlt in den mutanten Tieren der dorsale Teil des Trigeminus Ganglions, dessen Nervenzellen von den Neuralleistenzellen gebildet werden. Ebenso ist der proximale Anteil des Ganglion superius, der von Neuralleistenzellen gebildet wird, nicht vorhanden. Dagegen sind das Ganglion geniculi und der ventrale Teil des Trigeminus-Ganglions, die aus den Plakoden stammen, nur geringfügig beeinträchtigt. Diese Resultate zeigen, daß der ErbB2 Rezeptor während der Entwicklung der Neuralleistenzellen, die zu den Kranialganglien beitragen, eine entscheidende Rolle spielt. Weitgehend ähnliche Phänotypen wurden auch in NRG1 und ErbB3^{-/-} mutanten Tieren beobachtet. Dabei werden der ErbB2 und ErbB3 Rezeptor in den Neuralleistenzellen exprimiert, während NRG1 vom Kopfmesenchym und von plakodalen Zellen produziert wird. Auch hier wirkt das Signalübertragungssystem also in parakriner Weise.

4.3 Neurodegeneration im peripheren Nervensystem

Sowohl in den geretteten ErbB2^{-/-} als auch in ErbB3^{-/-} Tieren findet während der pränatalen Entwicklung eine massive Degeneration von sensorischen und motorischen Neuronen statt. Die Degeneration von sensorischen Neuronen in den Spinalganglien beginnt früher als die der motorischen Neuronen und nimmt in ihrem Ausmaß im Verlauf der Entwicklung dramatisch zu. Dabei sind diese

sensorischen Neuronen in den zervikalen, thorakalen und lumbalen Regionen in gleicher Weise betroffen. Dagegen zeigt der Verlust von Motoneuronen Unterschiede zwischen diesen Regionen und setzt im Vergleich zu den sensorischen Neuronen relativ spät ein. Ein ähnlicher Phänotyp wird auch in Tieren mit einer Isoform-spezifischen Mutation von NRG1 (Type III Mutation) beobachtet (Wolpowitz et al. 2000).

Signale, die das Überleben der sensorischen und motorischen Neuronen ermöglichen, können möglicherweise direkt von NRG1 gegeben werden. Dagegen spricht aber, daß der Neuregulin-Rezeptor ErbB3 nicht in Motoneuronen oder in sensorischen Neuronen exprimiert wird (Meyer et al. 1997). Außerdem zeigen Experimente in chimären Tieren, daß der ErbB3 Rezeptor nicht in einer zellautonomen Weise für das Überleben der Neuronen benötigt wird. Die Degeneration der Nerven ist also auf indirekte Mechanismen zurückzuführen.

Neurotrophe Signale können von den Zielorganen oder von Schwann'schen Zellen produziert werden. Der neurotrophe Faktor NT-3 wird von den Zielorganen der sensorischen Nerven, zum Beispiel der Haut, exprimiert. Verschiedenste Untersuchungen zeigen, daß Schwann'sche Zellen neurotrophische Faktoren wie etwa BDNF, GDNF, NT3, CNTF u.a. produzierten (Bunge 1994; Friedman et al. 1999). Der indirekte Effekt, den die Neurodegeneration verursacht, könnte also durch ein Fehlen der Schwann'schen Zellen bedingt sein. ErbB2 und ErbB3 werden aber auch in der Haut und in den Muskeln exprimiert. Die Produktion von neurotrophen Faktoren in den Zielorganen könnte also auch durch die ErbB2/ErbB3 Rezeptoren kontrolliert werden. Kürzlich konnte bewiesen werden, daß das Fehlen der Schwann'schen Zellen für die Neurodegeneration verantwortlich ist. Die Neurodegeneration wird auch in Sox10 mutanten Tieren beobachtet, die ebenfalls keine Schwann'schen Zellen besitzen (S. Britsch und C. Birchmeier, persönliche Mitteilung). Sox10 wird nur in Schwann'schen Zellen und nicht im Muskel exprimiert. In geretteten ErbB2^{-/-}, in ErbB3^{-/-} und in Sox10^{-/-} Tieren fehlen

Schwann'sche Zellen, die mit den peripheren Axonen assoziiert sind. Somit fehlen auch von diesen Zellen produzierte neurotrophe Faktoren, die während der Embryonalentwicklung für das Überleben der sensorischen Neuronen und der Motoneuronen essentiell sind. Welche Moleküle für die essentiellen neurotrophen Signale verantwortlich sind, die von Schwann'schen Zellen produziert werden, ist ungeklärt.

Zusätzlich zu den Schwann'schen Zellen können neurotrophe Faktoren auch im Skelettmuskel oder der Haut produziert werden. Die limitierte Verfügbarkeit solcher Faktoren führt bei 50-60% der Motoneuronen zum programmierten Zelltod während der Entwicklung (Lance Jones und Landmesser 1981; Oppenheim 1986). Dieser Vorgang begrenzt die Anzahl der Motoneuronen und eliminiert die, deren Axone ein falsches Ziel erreicht haben. Tiere, in denen durch Expression von Toxinen gezielt Muskelzellen entfernt wurden, zeigten einen Verlust von 90% der Motoneuronen (Grieshammer et al. 1998). In diesen muskellosen Tieren und den geretteten ErbB2^{-/-} oder ErbB3^{-/-} Mutanten ist der Zeitverlauf der Neurodegeneration nicht absolut identisch. In den muskellosen Tieren setzt das Absterben von sensorischen Neuronen erst am Tag 17,5 der Embryonalentwicklung ein. Zu diesem Zeitpunkt sind die meisten sensorischen Neuronen in den ErbB2^{-/-} und ErbB3^{-/-} Embryonen längst abgestorben. Früh in der Embryonalentwicklung sind sensorische Neuronen also von neurotrophen Faktoren, die von Schwann'schen Zellen produziert werden, abhängig. Spät in der Entwicklung ermöglichen dann neurotrophe Faktoren, die von Muskeln und Schwann'schen Zellen exprimiert werden, das Überleben von sensorischen und motorischen Neuronen. Diese Faktoren scheinen in unterschiedlichen, zum Teil überlappenden Zeitfenstern produziert zu werden, und ihre kombinatorische Verfügbarkeit sichert das Überleben dieser Neuronen.

4.4 Defaszikulierung von peripheren Nerven

In den geretteten ErbB2^{-/-} und ErbB3^{-/-} Embryonen beobachtete ich eine Defaszikulierung und Desorganisation von peripheren sensorischen und motorischen Nerven. Die gemischten peripheren Nerven bestehen aus einem sensorischen Anteil, der aus den Spinalganglien austritt und aus Motoneuronen, die aus dem Neuralrohr stammen, und werden durch Faserverteilung und Durchflechtung gebildet. Im Verlauf ihrer weiteren Entwicklung entstehen Seitenverzweigungen, die in einem charakteristischen Muster gebildet werden. In Abwesenheit von ErbB2 oder ErbB3 findet eine abnorme Bündelung dieser Nerven sowie ihrer Seitenverzweigungen statt. Diese abnorme Bündelung könnte auf das Fehlen der Schwann'schen Zellen in den Mutanten zurückzuführen sein. Hühnchen-Embryonen, bei denen durch Entfernung von Neuralleistenzellen die Bildung von Schwann'schen Zellen verhindert wurde, zeigen eine Defaszikulierung der Brachialnerven (Noakes et al. 1988). Schwann'sche Zellen umhüllen Nerven als nicht-myelinisierende Schwann'sche Zellen oder durch ihre Myelinscheide; sie bilden auch Zelladhäsionsmoleküle, die zur Bündelung der peripheren Nerven beitragen können. Spät in der Entwicklung tragen sie zur Entwicklung der Schutzhüllen der Nerven, des Perineuriums, bei. Sie produzieren zum Beispiel den Faktor Desert hedgehog, der für die Reifung des Perineuriums benötigt wird. Da ErbB2 und ErbB3 auch in den Innervationsgebieten exprimiert werden, könnten Wechselwirkungen in diesen Regionen die Faszikulierung modulieren. Auch in den proximalen Regionen führt die Defaszikulierung zur Bildung mehrfach getrennter und parallel verlaufender dünner Axonenbündel; der Phänotyp ist aber erst in den distalen Regionen ausgesprochen dramatisch und könnte selbst dazu führen, daß distal nicht die korrekten Ziele innerviert werden.

4.5 Die neuromuskulären Synapsen

Die neuromuskuläre Synapse besteht aus der präsynaptischen Nervendingung, der postsynaptischen Muskelmembran und Schwann'schen Zellen und differenziert sich durch reziproke induktive Signale, die zwischen diesen Strukturen ausgetauscht werden (Burden 1998; Sanes et al. 1998). Dabei wird die postsynaptische Differenzierung in den Muskelfasern durch neuronale Signale eingeleitet, wobei retrograde Signale die präsynaptische Spezialisierung induzieren. Terminale Schwann'sche Zellen liefern neurotrophe Faktoren und sind bei der Bildung, Funktion und Erhaltung von neuromuskulären Synapsen beteiligt. Neuregulin, das von Nerven- oder Muskelzellen gebildet wird, aktiviert die ErbB2 und ErbB3 Rezeptoren, die in Schwann'schen Zellen exprimiert werden oder die ErbB2, ErbB3 und ErbB4 Rezeptoren, die im Muskel exprimiert werden. Dieses Signal kann die Differenzierungsvorgänge an der Synapse beeinflussen. In vitro führt NRG1 zur erhöhten Expression von AChR Untereinheiten in Muskelfasern, die sich aus kultivierten Myoblasten bilden. Die Inhibierung des MAPK Signaltransduktionsweges führt zur Verhinderung der Neuregulin-induzierten Expression der AChR Untereinheiten. Dabei können die aus ErbB2/ErbB3 oder ErbB2/ErbB4 bestehenden Rezeptor-Heteromere das NRG-Signal weiterleiten. Aufgrund dieser Erkenntnisse wird für den NRG/ErbB Signaltransduktionsweg eine Rolle bei der postsynaptischen Genexpression in vivo postuliert. Die Expression von NRG1 in Motoneuronen, der Transport des Faktors entlang der Axone, seine Freisetzung an der synaptischen Basallamina und die postsynaptische Aggregation seiner Rezeptoren unterstützen diese Annahme. In den Promotoren der AChR Gene wurden regulatorische Sequenzen, NRE (Neuregulin Responsive Element), identifiziert, die von zwei Transkriptionsfaktoren (GABP α und GABP β) erkannt werden. In transgenen Mäusen, in denen die Expression eines Reportergens (human Growth Hormone, hGH) durch den Promotor der δ -AChR Untereinheit kontrolliert wird, zeigen, daß NRE im Promotor für die postsynaptische Expression notwendig ist (Fromm und Burden 1998). Trotz dieser postulierten Funktion sind die beobachteten postsynaptischen Veränderungen in geretteten ErbB2 $^{-/-}$ und ErbB3 $^{-/-}$

Mutanten subtil, und die postsynaptische Expression von AChR Untereinheiten ist vorhanden. Die geretteten ErbB2^{-/-} und ErbB3^{-/-}-Embryonen zeigen aber Defekte in der präsynaptischen Differenzierung. Die Axone des N. phrenicus sind defaszikulierte und ungeordnet, und Nervenendigungen ziehen sich zurück und der Nerv degeneriert. Zeitweise sind synaptische Kontakte vorhanden, die die postsynaptische Genexpression induzieren. Die extrasynaptische Repression ist aber unvollständig, und es ist unklar, welcher Mechanismus dafür verantwortlich ist. Der ErbB2 Rezeptor könnte einerseits einen direkten Einfluss auf extra-synaptische Repressionsvorgänge nehmen. Andererseits könnten Probleme in der Innervation, die durch Defaszikulierung und Retraktion des Nervs entstehen, diesen Phänotyp hervorrufen. Die Retraktion und Degeneration des Nervs steht mit dem Fehlen der Schwann'schen Zellen in Zusammenhang und ist der Hauptgrund für den Atmungsdefekt, der dazu führt, daß die mutanten Tiere bei der Geburt sterben. Schwann'sche Zellen produzieren neurotrophe Faktoren, bündeln die Axone und sind an der Regulation der intramuskulären Nerv-Verzweigungen beteiligt. In ihrer Abwesenheit könnten die abnormen intramuskulären Verzweigungen des Nervs zu ektopischen Synapsen und möglicherweise zur Mißprojektion der Nervenendigungen führen. Tatsächlich bildet ein Teil der Nervenendigungen keine synaptischen Kontakte in den geretteten ErbB2^{-/-} Tieren. Andere bilden mehrere überlappende synaptische Kontaktstellen, während in Kontrolltieren jeweils immer eine einzelne Synapse an den Nervenendigungen lokalisiert ist.

In Abwesenheit von ErbB2 oder ErbB3 Rezeptor-Tyrosinkinase findet die postsynaptische Expression der Untereinheiten der AChR Gene statt, und der Rezeptor wird aggregiert. Diese überraschenden Resultate zeigen, daß ErbB2 oder ErbB3 für die postsynaptische Genexpression der AChR Untereinheit nicht essentiell sind. Da die drei Neuregulin Rezeptoren ErbB2, ErbB3 und ErbB4 im Muskel exprimiert werden, könnten in den mutanten Tieren die anderen, noch vorhandenen Rezeptoren kompensatorisch wirken. Auch eine Kompensation durch den Agrin/Musk-Signaltransduktionsweg ist denkbar. Die Dichte der Acetylcholin-Rezeptoren ist

reduziert in adulten Mäusen mit einer heterozygoten Isoform-spezifischen Mutation in NRG1 (Mutation im Exon, das für die Ig-Domäne kodiert) (Sandrock et al. 1997). Elektrophysiologische Messungen zeigten, daß in solchen Tieren der post-synaptische Defekt durch eine erhöhte präsynaptische Freisetzung von Acetylcholin kompensiert wird. Somit übernimmt der NRG/ErbB Signaltransduktionsweg eine Rolle in der funktionellen Stabilisierung und Erhaltung der neuromuskulären Synapse.

5 Zusammenfassung

ErbB2 gehört zu den Klasse I Rezeptor-Tyrosinkinasen und funktioniert als Korezeptor bei der Vermittlung des Neuregulin-Signals. Während der Embryonalentwicklung wird ErbB2 im Herzen, in den Neuralleistenzellen, im Muskel und in den Epithelien exprimiert (Kokai et al. 1987). Embryonen mit einer Null-Mutation im ErbB2 Gen sterben am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung. Die Mutation bewirkt eine morphogenetische Fehlbildung des Herzens, die durch das Fehlen von ventrikulären Trabekeln gekennzeichnet ist (Lee et al. 1995). Weiterhin zeigen diese Embryonen Defekte in den Kranialganglien und in der primären sympathischen Ganglien-Kette, die von Neuralleistenzellen gebildet werden (Lee et al. 1995; Erickson et al. 1997; Britsch et al. 1998).

Die herzspezifische Expression von ErbB2 cDNA ermöglicht ErbB2^{-/-} Tieren, sich bis zur Geburt zu entwickeln. Dies erlaubte mir, spätere Funktionen des Rezeptors zu untersuchen. In den geretteten ErbB2^{-/-} Embryonen erfolgte die Bildung der ventrikulären Trabekel, der fingerähnlichen Ausstülpungen des Myokards, zwischen dem 9. und 10. Tag in der Embryonalentwicklung. In den späteren Phasen der intrauterinen Entwicklung war das Herz der geretteten Tiere normal ausgebildet. In den ErbB2^{-/-}R Embryonen fehlten Schwann'sche Zellen entlang der peripheren Nerven. Die Abwesenheit von Schwann'schen Zellen führte zum massiven Absterben von sensorischen und motorischen Neuronen des Rückenmarkes. Dabei zeigten sensorische Neuronen eine frühe Abhängigkeit von neurotrophen Faktoren,

die von Schwann'schen Zellen produziert werden, während Motoneuronen diese Faktoren in einer späteren Phase benötigen. Zusätzlich ist bekannt, daß sensorische Neuronen und Motoneuronen neurotrophe Faktoren benötigen, die von den Zielorganen, z.B. den Muskeln, produziert werden. Motoneuronen im thorakalen Rückenmark sind nur minimal betroffen, während die Degeneration von Motoneuronen in den zervikalen und lumbalen Segmenten stark ausgeprägt ist. Verschiedene Motoneuron-Typen unterscheiden sich also in ihrer Abhängigkeit von neurotrophen Signalen. Weiterhin sind die peripheren Nerven der ErbB2-/-R Tiere defaszikulierte und ungeordnet. Der N. phrenicus, der das Diaphragma innerviert, retrahiert und ist am Tag 17 der Entwicklung vollständig degeneriert. Deshalb können die mutanten Tiere bei der Geburt nicht atmen und sterben infolgedessen. Überraschenderweise erfolgt in den geretteten ErbB2-/-R Embryonen die postsynaptische Expression und Aggregation der Acetylcholin-Rezeptoren. Die Phänotypen der ErbB2-/-R und ErbB3-/- mutanten Tieren sind sehr ähnlich. Dies zeigt, daß ErbB2 eine essentielle Korezeptor-Funktion für ErbB3 in der Vermittlung der Neuregulin-Signale übernimmt.

6 Ausblick

Der NRG/ErbB Signaltransduktionsweg erfüllt vielfache und essentielle Funktionen während der Embryonalentwicklung (Lemke 1996; Burden und Yarden 1997). Die geretteten ErbB2-/-, ErbB3-/- und NRG1 TypIII-/- Embryonen haben die Untersuchung der entwicklungsbiologischen Funktionen des NRG/ErbB Signaltransduktionsweges bis zur Geburt möglich gemacht. Die aus diesen Embryonen isolierbaren Zellen und Gewebe können für biochemische und zellbiologische Untersuchungen eingesetzt werden. Ein wichtiges Resultat meiner Arbeit war die Erkenntnis, daß Schwann'sche Zellen essentielle neurotrophe Signale produzieren. Die Identifizierung solcher Faktoren könnte von therapeutischem Nutzen bei der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen sein. Erstaunlicherweise war die Expression von postsynaptischen Genen in den mutanten Tieren vorhanden. Die Herstellung von Tieren mit Mutationen in den ErbB2, ErbB3 und ErbB4 Rezeptor-

Genen kann zur Klärung der für diesen Signaltransduktionsweg postulierten Funktion in der Induktion der postsynaptischen AChR-Genexpression beitragen. Für die Untersuchung der Rolle des NRG/ErbB Signaltransduktionsweges in der postnatalen Entwicklung und in adulten Tieren können konditionelle „knock out“-Experimente, in denen gewebsspezifische Mutationen eingeführt werden, nützlich sein. Der ErbB2 Signalübertragungsweg übernimmt auch wichtige Funktionen in der Krebsentstehung beim Menschen. Inhibitoren, die ErbB2 Signale unterbinden, werden bereits in der Therapie eingesetzt, und neue Inhibitoren werden gesucht. Das Wissen über die Funktion dieses Signaltransduktionsweges in der normalen Physiologie wird deshalb wichtig werden, um Nebenwirkungen solcher Inhibitoren abzuschätzen.

7 Literaturverzeichnis

Acheson, A., P. A. Barker, et al. (1991). "Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF." *Neuron* 7(2): 265-75.

Adlkofer, K. and C. Lai (2000). "Role of neuregulins in glial cell development." *Glia* 29(2): 104-11.

Alroy, I. and Y. Yarden (1997). "The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions." *FEBS Lett* 410(1): 83-6.

Baker, C. V. and M. Bronner Fraser (1997). "The origins of the neural crest. Part I: embryonic induction." *Mech Dev* 69(1-2): 3-11.

Baker, C. V., M. Bronner Fraser, et al. (1997). "Early- and late-migrating cranial neural crest cell populations have equivalent developmental potential in vivo." *Development* 124(16): 3077-87.

Beerli, R. R., D. Graus Porta, et al. (1995). "Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2." *Mol Cell Biol* 15(12): 6496-505.

Bermingham McDonogh, O., Y. T. Xu, et al. (1997). "Neuregulin expression in PNS neurons: isoforms and regulation by target interactions." *Mol Cell Neurosci* 10(3-4): 184-95.

Bork, P. and B. Margolis (1995). "A phosphotyrosine interaction domain [letter]." *Cell* 80(5): 693-4.

Britsch, S., L. Li, et al. (1998). "The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system." *Genes Dev* 12(12): 1825-36.

Britsch, S., L. Li, et al. (1998). "The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system." *Genes Dev* 12(12): 1825-36.

Bronner Fraser, M. (1993). "Mechanisms of neural crest cell migration." *Bioessays* 15(4): 221-30.

Bunge, M. B., A. K. Williams, et al. (1982). "Neuron-Schwann cell interaction in basal lamina formation." *Dev Biol* 92(2): 449-60.

- Bunge, R. P. (1994). "The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration." *J Neurol* 242(1 Suppl 1): S19-21.
- Burden, S. and Y. Yarden (1997). "Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis." *Neuron* 18(6): 847-55.
- Burden, S. J. (1998). "The formation of neuromuscular synapses." *Genes Dev* 12(2): 133-48.
- Carraway, K. L., 3rd and L. C. Cantley (1994). "A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling." *Cell* 78(1): 5-8.
- Carraway, K. L., 3rd, M. X. Sliwkowski, et al. (1994). "The erbB3 gene product is a receptor for heregulin." *J Biol Chem* 269(19): 14303-6.
- Carraway, K. L., 3rd, S. P. Soltoff, et al. (1995). "Heregulin stimulates mitogenesis and phosphatidylinositol 3-kinase in mouse fibroblasts transfected with erbB2/neu and erbB3." *J Biol Chem* 270(13): 7111-6.
- Carraway, K. L., 3rd, J. L. Weber, et al. (1997). "Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases." *Nature* 387(6632): 512-6.
- Chang, H., D. J. Riese, 2nd, et al. (1997). "Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene." *Nature* 387(6632): 509-12.
- Cheng, A. M., T. M. Saxton, et al. (1998). "Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation." *Cell* 95(6): 793-803.
- Chiu, A. Y. and J. R. Sanes (1984). "Development of basal lamina in synaptic and extrasynaptic portions of embryonic rat muscle." *Dev Biol* 103(2): 456-67.
- Cochet, C., O. Filhol, et al. (1991). "Interaction between the epidermal growth factor receptor and phosphoinositide kinases." *J Biol Chem* 266(1): 637-44.
- Corfas, G., D. L. Falls, et al. (1993). "ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, also induces tyrosine phosphorylation of a 185-kDa muscle transmembrane protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(4): 1624-8.
- Corfas, G., K. M. Rosen, et al. (1995). "Differential expression of ARIA isoforms in the rat brain." *Neuron* 14(1): 103-15.
- Daub, H., F. U. Weiss, et al. (1996). "Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors." *Nature* 379(6565): 557-60.

DiStefano, P. S., B. Friedman, et al. (1992). "The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons." *Neuron* 8(5): 983-93.

Doe, C. Q. and J. R. Sanes (2000). "Development: neural development at the millennium." *Curr Opin Neurobiol* 10(1): 31.

Dong, Z., A. Brennan, et al. (1995). "Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors." *Neuron* 15(3): 585-96.

Duclert, A. and J. P. Changeux (1995). "Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction." *Physiol Rev* 75(2): 339-68.

Durbec, P., C. V. Marcos Gutierrez, et al. (1996). "GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase [see comments]." *Nature* 381(6585): 789-93.

Durbec, P. L., L. B. Larsson Blomberg, et al. (1996). "Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts." *Development* 122(1): 349-58.

Edery, P., C. Eng, et al. (1997). "RET in human development and oncogenesis." *Bioessays* 19(5): 389-95.

Eftimie, R., H. R. Brenner, et al. (1991). "Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(4): 1349-53.

Erickson, C. A. and R. Perris (1993). "The role of cell-cell and cell-matrix interactions in the morphogenesis of the neural crest." *Dev Biol* 159(1): 60-74.

Erickson, S. L., K. S. O'Shea, et al. (1997). "ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and heregulin-deficient mice." *Development* 124(24): 4999-5011.

Ericson, J., S. Thor, et al. (1992). "Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*." *Science* 256(5063): 1555-60.

Ericson, J., S. Morton, et al. (1996). "Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity." *Cell* 87(4): 661-73.

Falls, D. L., K. M. Rosen, et al. (1993). "ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family." *Cell* 72(5): 801-15.

Feng, G., M. B. Laskowski, et al. (2000). "Roles for ephrins in positionally selective synaptogenesis between motor neurons and muscle fibers." *Neuron* 25(2): 295-306.

Fernandes, A., A. W. Hamburger, et al. (1999). "ErbB-2 kinase is required for constitutive stat 3 activation in malignant human lung epithelial cells." *Int J Cancer* 83(4): 564-70.

Fietz, M. J., J. P. Concordet, et al. (1994). "The hedgehog gene family in *Drosophila* and vertebrate development." *Dev Suppl*: 43-51.

Frank, E. and J. R. Sanes (1991). "Lineage of neurons and glia in chick dorsal root ganglia: analysis in vivo with a recombinant retrovirus." *Development* 111(4): 895-908.

Friedman, H. C., A. J. Aguayo, et al. (1999). "Trophic factors in neuron-Schwann cell interactions." *Ann N Y Acad Sci* 883: 427-38.

Fromm, L. and S. J. Burden (1998). "Transcriptional pathways for synapse-specific, neuregulin-induced and electrical activity-dependent transcription." *J Physiol Paris* 92(3-4): 173-6.

Fromm, L. and S. J. Burden (1998). "Synapse-specific and neuregulin-induced transcription require an ets site that binds GABPalpha/GABPbeta." *Genes Dev* 12(19): 3074-83.

Garratt, A. N., O. Voiculescu, et al. (2000). "A dual role of erbB2 in myelination and in expansion of the schwann cell precursor pool." *J Cell Biol* 148(5): 1035-46.

Gassmann, M., F. Casagrande, et al. (1995). "Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor [see comments]." *Nature* 378(6555): 390-4.

Gassmann, M. and G. Lemke (1997). "Neuregulins and neuregulin receptors in neural development." *Curr Opin Neurobiol* 7(1): 87-92.

Goodearl, A. D., A. G. Yee, et al. (1995). "ARIA is concentrated in the synaptic basal lamina of the developing chick neuromuscular junction." *J Cell Biol* 130(6): 1423-34.

Graus Porta, D., R. R. Beerli, et al. (1995). "Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling." *Mol Cell Biol* 15(3): 1182-91.

Graus Porta, D., R. R. Beerli, et al. (1997). "ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling." *Embo J* 16(7): 1647-55.

Grieshammer, U., M. Lewandoski, et al. (1998). "Muscle-specific cell ablation conditional upon Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice leads to massive spinal and cranial motoneuron loss." *Dev Biol* 197(2): 234-47.

Guy, P. M., J. V. Platko, et al. (1994). "Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(17): 8132-6.

Hall, Z. W. and J. R. Sanes (1993). "Synaptic structure and development: the neuromuscular junction." *Cell* 72: 99-121.

Harari, D., E. Tzahar, et al. (1999). "Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase." *Oncogene* 18(17): 2681-9.

Henderson, C. E., H. S. Phillips, et al. (1994). "GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle [see comments] [published erratum appears in *Science* 1995 Feb 10;267(5199):777]." *Science* 266(5187): 1062-4.

Hirano, T., K. Nakajima, et al. (1997). "Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system." *Cytokine Growth Factor Rev* 8(4): 241-52.

Ho, W. H., M. P. Armanini, et al. (1995). "Sensory and motor neuron-derived factor. A novel heregulin variant highly expressed in sensory and motor neurons [published erratum appears in *J Biol Chem* 1995 Nov 3;270(44):26722]." *J Biol Chem* 270(24): 14523-32.

Holmes, W. E., M. X. Sliwkowski, et al. (1992). "Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2." *Science* 256(5060): 1205-10.

Homma, S., R. W. Oppenheim, et al. (2000). "Expression pattern of GDNF, c-ret, and GFRalphas suggests novel roles for GDNF ligands during early organogenesis in the chick embryo." *Dev Biol* 217(1): 121-37.

Houenou, L. J., L. Li, et al. (1994). "Naturally occurring and axotomy-induced motoneuron death and its prevention by neurotrophic agents: a comparison between chick and mouse." *Prog Brain Res* 102: 217-26.

Huang, C. F., B. E. Flucher, et al. (1994). "Depolarization-transcription signals in skeletal muscle use calcium flux through L channels, but bypass the sarcoplasmic reticulum [retracted by Schmidt J. In: *Neuron* 1998 Jun;20(6):following 1294]." *Neuron* 13(1): 167-77.

Hunter, T. (1991). "Protein kinase classification." *Methods Enzymol* 200: 3-37.

Iwasaki, M., A. X. Le, et al. (1997). "Expression of indian hedgehog, bone morphogenetic protein 6 and gli during skeletal morphogenesis." *Mech Dev* 69(1-2): 197-202.

Jessen, K. R., A. Brennan, et al. (1994). "The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves." *Neuron* 12(3): 509-27.

Jessen, K. R. and R. Mirsky (1997). "Embryonic Schwann cell development: the biology of Schwann cell precursors and early Schwann cells." *J Anat* 191(Pt 4): 501-5.

Jessen, K. R. and R. Mirsky (1998). "Origin and early development of Schwann cells." *Microsc Res Tech* 41(5): 393-402.

Jin, J. J., A. Nikitin, et al. (1993). "Schwann cell lineage-specific neu (erbB-2) gene expression in the developing rat nervous system." *Cell Growth Differ* 4(3): 227-37.

Jo, S. A., X. Zhu, et al. (1995). "Neuregulins are concentrated at nerve-muscle synapses and activate ACh-receptor gene expression." *Nature* 373(6510): 158-61.

Johnson, J. E., Y. Q. Wei, et al. (1995). "Brain-derived proteins that rescue spinal motoneurons from cell death in the chick embryo: comparisons with target-derived and recombinant factors." *J Neurobiol* 27(4): 573-89.

Kameda, T., W. Yasui, et al. (1990). "Expression of ERBB2 in human gastric carcinomas: relationship between p185ERBB2 expression and the gene amplification." *Cancer Res* 50(24): 8002-9.

Kavanaugh, W. M., C. W. Turck, et al. (1995). "PTB domain binding to signaling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine." *Science* 268(5214): 1177-9.

Klarsfeld, A., R. Laufer, et al. (1989). "Regulation of muscle AChR alpha subunit gene expression by electrical activity: involvement of protein kinase C and Ca²⁺." *Neuron* 2(3): 1229-36.

Kokai, Y., J. A. Cohen, et al. (1987). "Stage- and tissue-specific expression of the neu oncogene in rat development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(23): 8498-501.

Kramer, R., N. Bucay, et al. (1996). "Neuregulins with an Ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(10): 4833-8.

Lance Jones, C. and L. Landmesser (1981). "Pathway selection by embryonic chick motoneurons in an experimentally altered environment." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 214(1194): 19-52.

Landmesser, L. (1992). "The relationship of intramuscular nerve branching and synaptogenesis to motoneuron survival." *J Neurobiol* 23(9): 1131-9.

Le Douarin, N. M. and E. Dupin (1993). "Cell lineage analysis in neural crest ontogeny." *J Neurobiol* 24(2): 146-61.

Lee, K. F., H. Simon, et al. (1995). "Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development [see comments]." *Nature* 378(6555): 394-8.

Lemke, G. (1996). "Neuregulins in development." *Mol Cell Neurosci* 7(4): 247-62.

Lemmon, M. A., Z. Bu, et al. (1997). "Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer." *Embo J* 16(2): 281-94.

Li, L., W. Wu, et al. (1995). "Rescue of adult mouse motoneurons from injury-induced cell death by glial cell line-derived neurotrophic factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(21): 9771-5.

Lin, W., H. B. Sanchez, et al. (2000). "Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in erbB2-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(3): 1299-304.

Lints, T. J., L. M. Parsons, et al. (1993). "Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants [published erratum appears in *Development* 1993 Nov;119(3):969]." *Development* 119(2): 419-31.

Lo, A. C., L. J. Houenou, et al. (1995). "Apoptosis in the nervous system: morphological features, methods, pathology, and prevention." *Arch Histol Cytol* 58(2): 139-49.

Loeb, J. A. and G. D. Fischbach (1995). "ARIA can be released from extracellular matrix through cleavage of a heparin-binding domain." *J Cell Biol* 130(1): 127-35.

Loeb, J. A. and G. D. Fischbach (1997). "Neurotrophic factors increase neuregulin expression in embryonic ventral spinal cord neurons." *J Neurosci* 17(4): 1416-24.

Loeb, J. A., T. S. Khurana, et al. (1999). "Expression patterns of transmembrane and released forms of neuregulin during spinal cord and neuromuscular synapse development." *Development* 126(4): 781-91.

Marchionni, M. A., A. D. Goodearl, et al. (1993). "Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system [see comments]." *Nature* 362(6418): 312-8.

Marigo, V., R. A. Davey, et al. (1996). "Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor [see comments]." *Nature* 384(6605): 176-9.

Massague, J. and A. Pandiella (1993). "Membrane-anchored growth factors." *Annu Rev Biochem* 62: 515-41.

Meyer, D. and C. Birchmeier (1994). "Distinct isoforms of neuregulin are expressed in mesenchymal and neuronal cells during mouse development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(3): 1064-8.

Meyer, D. and C. Birchmeier (1995). "Multiple essential functions of neuregulin in development [see comments] [published erratum appears in *Nature* 1995 Dec 14;378(6558):753]." *Nature* 378(6555): 386-90.

Meyer, D., T. Yamaai, et al. (1997). "Isoform-specific expression and function of neuregulin." *Development* 124(18): 3575-86.

Noakes, P. G., M. R. Bennett, et al. (1988). "Migration of Schwann cells and axons into developing chick forelimb muscles following removal of either the neural tube or the neural crest." *J Comp Neurol* 277(2): 214-33.

Okamoto, M., C. Lee, et al. (1997). "Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in vitro." *Cancer Res* 57(1): 141-6.

Olayioye, M. A., I. Beuvink, et al. (1999). "ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases." *J Biol Chem* 274(24): 17209-18.

Oppenheim, R. W. (1986). "The absence of significant postnatal motoneuron death in the brachial and lumbar spinal cord of the rat." *J Comp Neurol* 246(2): 281-6.

Oppenheim, R. W., L. J. Houenou, et al. (1995). "Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF [see comments]." *Nature* 373(6512): 344-6.

Ozaki, M., M. Sasner, et al. (1997). "Neuregulin-beta induces expression of an NMDA-receptor subunit." *Nature* 390(6661): 691-4.

Pachnis, V., B. Mankoo, et al. (1993). "Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis." *Development* 119(4): 1005-17.

Parmantier, E., B. Lynn, et al. (1999). "Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths [see comments]." *Neuron* 23(4): 713-24.

Pathak, I. C. (1965). "Hirschsprung's disease: a review." *Indian J Pediatr* 32(213): 323-30.

Pawson, T. and G. D. Gish (1992). "SH2 and SH3 domains: from structure to function." *Cell* 71(3): 359-62.

Pawson, T. and J. D. Scott (1997). "Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins." *Science* 278(5346): 2075-80.

Pawson, T. and T. M. Saxton (1999). "Signaling networks--do all roads lead to the same genes? [comment]." *Cell* 97(6): 675-8.

Peirano, R. I., D. E. Goerich, et al. (2000). "Protein zero gene expression is regulated by the glial transcription factor Sox10." *Mol Cell Biol* 20(9): 3198-209.

Peles, E., S. S. Bacus, et al. (1992). "Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells." *Cell* 69(1): 205-16.

Peles, E. and Y. Yarden (1993). "Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors." *Bioessays* 15(12): 815-24.

Pinkas Kramarski, R., A. E. Lenferink, et al. (1998). "The oncogenic ErbB-2/ErbB-3 heterodimer is a surrogate receptor of the epidermal growth factor and betacellulin." *Oncogene* 16(10): 1249-58.

Plowman, G. D., J. M. Culouscou, et al. (1993). "Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(5): 1746-50.

Prigent, S. A. and N. R. Lemoine (1992). "The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands." *Prog Growth Factor Res* 4(1): 1-24.

Qiu, Y., L. Ravi, et al. (1998). "Requirement of ErbB2 for signalling by interleukin-6 in prostate carcinoma cells." *Nature* 393(6680): 83-5.

Riethmacher, D., E. Sonnenberg Riethmacher, et al. (1997). "Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor." *Nature* 389(6652): 725-30.

Robitaille, R. (1998). "Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction [see comments]." *Neuron* 21(4): 847-55.

Rosen, K. M., A. W. Sandrock, Jr., et al. (1996). "The role of neuregulin (ARIA) at the neuromuscular junction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61: 427-34.

Sandrock, A. W., Jr., S. E. Dryer, et al. (1997). "Maintenance of acetylcholine receptor number by neuregulins at the neuromuscular junction in vivo." *Science* 276(5312): 599-603.

Sanes, J. R., E. D. Apel, et al. (1998). "Development of the neuromuscular junction: genetic analysis in mice." *J Physiol Paris* 92(3-4): 167-72.

Sauter, G., H. Moch, et al. (1993). "Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer." *Cancer Res* 53(10 Suppl): 2199-203.

Sawa, C., M. Goto, et al. (1996). "Functional domains of transcription factor hGABP beta1/E4TF1-53 required for nuclear localization and transcription activation." *Nucleic Acids Res* 24(24): 4954-61.

Schaeffer, H. J., A. D. Catling, et al. (1998). "MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade [see comments]." *Science* 281(5383): 1668-71.

Schaeffer, L., N. Duclert, et al. (1998). "Implication of a multisubunit Ets-related transcription factor in synaptic expression of the nicotinic acetylcholine receptor." *Embo J* 17(11): 3078-90.

Schreiber, J., E. Riethmacher Sonnenberg, et al. (2000). "Placental failure in mice lacking the mammalian homolog of glial cells missing, GCMa." *Mol Cell Biol* 20(7): 2466-74.

Selleck, M. A., T. Y. Scherson, et al. (1993). "Origins of neural crest cell diversity." *Dev Biol* 159(1): 1-11.

Shah, N. M., M. A. Marchionni, et al. (1994). "Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate." *Cell* 77(3): 349-60.

Shi, D., G. He, et al. (1992). "Overexpression of the c-erbB-2/neu-encoded p185 protein in primary lung cancer." *Mol Carcinog* 5(3): 213-8.

Si, J., Q. Wang, et al. (1999). "Essential roles of c-JUN and c-JUN N-terminal kinase (JNK) in neuregulin-increased expression of the acetylcholine receptor epsilon-subunit." *J Neurosci* 19(19): 8498-508.

Si, J. and L. Mei (1999). "ERK MAP kinase activation is required for acetylcholine receptor inducing activity-induced increase in all five acetylcholine receptor subunit mRNAs as well as synapse-specific expression of acetylcholine receptor varepsilon-transgene." *Brain Res Mol Brain Res* 67(1): 18-27.

Sliwkowski, M. X., G. Schaefer, et al. (1994). "Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin." *J Biol Chem* 269(20): 14661-5.

Son, Y. J. and W. J. Thompson (1995). "Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons." *Neuron* 14(1): 125-32.

Teale, J. D., T. Davies, et al. (1972). "High and low molecular weight forms of pancreatic cholesterol esterase." *Biochem Biophys Res Commun* 47(1): 234-43.

Treanor, J. J., L. Goodman, et al. (1996). "Characterization of a multicomponent receptor for GDNF [see comments]." *Nature* 382(6586): 80-3.

Tsuchida, T., M. Ensini, et al. (1994). "Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes [see comments]." *Cell* 79(6): 957-70.

Tzahar, E., G. Levkowitz, et al. (1994). "ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/heregulin isoforms." *J Biol Chem* 269(40): 25226-33.

Tzahar, E., H. Waterman, et al. (1996). "A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor." *Mol Cell Biol* 16(10): 5276-87.

Tzahar, E., R. Pinkas Kramarski, et al. (1997). "Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network." *Embo J* 16(16): 4938-50.

Ullrich, A. and J. Schlessinger (1990). "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity." *Cell* 61(2): 203-12.

van de Vijver, M., R. van de Bersselaar, et al. (1987). "Amplification of the neu (c-erbB-2) oncogene in human mammary tumors is relatively frequent and is often accompanied by amplification of the linked c-erbA oncogene." *Mol Cell Biol* 7(5): 2019-23.

van der Geer, P., T. Hunter, et al. (1994). "Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways." *Annu Rev Cell Biol* 10: 251-337.

Wehrle Haller, B. and J. A. Weston (1995). "Soluble and cell-bound forms of steel factor activity play distinct roles in melanocyte precursor dispersal and survival on the lateral neural crest migration pathway." *Development* 121(3): 731-42.

Wen, D., E. Peles, et al. (1992). "Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit." *Cell* 69(3): 559-72.

Woldeyesus, M. T., S. Britsch, et al. (1999). "Peripheral nervous system defects in erbB2 mutants following genetic rescue of heart development." *Genes Dev* 13(19): 2538-48.

Wolpowitz, D., T. B. Mason, et al. (2000). "Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses." *Neuron* 25(1): 79-91.

Won, S., J. Si, et al. (1999). "Neuregulin-increased expression of acetylcholine receptor epsilon-subunit gene requires ErbB interaction with Shc." *J Neurochem* 73(6): 2358-68.

Wrana, J. and T. Pawson (1997). "Signal transduction. Mad about SMADs [news; comment]." *Nature* 388(6637): 28-9.

Wu, L. G. and W. J. Betz (1996). "Nerve activity but not intracellular calcium determines the time course of endocytosis at the frog neuromuscular junction." *Neuron* 17(4): 769-79.

Yang, Y., E. Spitzer, et al. (1995). "Sequential requirement of hepatocyte growth factor and neuregulin in the morphogenesis and differentiation of the mammary gland." *J Cell Biol* 131(1): 215-26.

Yang, J. F., H. Zhou, et al. (1998). "Cloning of cDNAs encoding xenopus neuregulin: expression in myotomal muscle during embryo development." *Brain Res Mol Brain Res* 58(1-2): 59-73.

Yang, J. F., H. Zhou, et al. (1999). "A cysteine-rich form of *Xenopus* neuregulin induces the expression of acetylcholine receptors in cultured myotubes." *Mol Cell Neurosci* 13(6): 415-29.

Yarden, Y. and A. Ullrich (1988). "Growth factor receptor tyrosine kinases." *Annu Rev Biochem* 57: 443-78.

Yokota, J., T. Yamamoto, et al. (1986). "Amplification of c-erbB-2 oncogene in human adenocarcinomas in vivo." *Lancet* 1(8484): 765-7.

Zhang, X., E. Silva, et al. (1989). "Amplification and rearrangement of c-erb B proto-oncogenes in cancer of human female genital tract." *Oncogene* 4(8): 985-9.

Zhang, D., G. Frantz, et al. (1998). "New branches on the neuregulin family tree [news]." *Mol Psychiatry* 3(2): 112-5.

Zhou, D. J., H. Ahuja, et al. (1989). "Proto-oncogene abnormalities in human breast cancer: c-ERBB-2 amplification does not correlate with recurrence of disease." *Oncogene* 4(1): 105-8.

Zhou, S., B. Margolis, et al. (1995). "The phosphotyrosine interaction domain of SHC recognizes tyrosine-phosphorylated NPXY motif." *J Biol Chem* 270(25): 14863-6.

Zorick, T. S. and G. Lemke (1996). "Schwann cell differentiation." *Curr Opin Cell Biol* 8(6): 870-6.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Priv. Doz. Dr. Carmen Birchmeier für die Überlassung des interessanten Themas, für die Betreuung, für ihre ständige Diskussionsbereitschaft, für die vielen fachlichen Hinweise, Anregungen und Ratschläge, die diese Arbeit stets begleitet haben.

Ich bedanke mich auch bei Dr. S. Britsch und Dr. D. Riethmacher für die Hilfe bei der in situ Hybridisierung und bei der Zählung von sensorischen Neuronen.

Herzlichen Dank auch allen Kolleginnen und Kollegen für die gute Zusammenarbeit und die gute Atmosphäre im Labor.

Und ein ganz persönlicher Dank gilt Dörte Schüssler für das Verständnis und die Unterstützung, die ich durchgehend von ihr erfahren habe.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe, daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie abgesehen von der unten angegebenen Teilpublikation noch nicht veröffentlicht worden ist.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Priv. Doz. Dr. Carmen Birchmeier und Prof. Dr. H. Saumweber betreut worden.

Masresha T. Woldeyesus

Ein Teil dieser Arbeit ist bereits in folgender Publikation veröffentlicht worden:

Woldeyesus, M. T., S. Britsch, D. Riethmacher, L. Xu, E. Sonnenberg Riethmacher, F. Abou Rebyeh, R. Harvey, P. Caroni and C. Birchmeier (1999). Peripheral nervous system defects in erbB2 mutants following genetic rescue of heart development. Genes Dev **13**(19): 2538-48.

Lebenslauf

Name: Masresha Tsegaye Woldeyesus
Geburtsdatum: 14.05.66
Geburtsland: Äthiopien
Nationalität: Äthiopisch
Familienstand: ledig
1971-1977 Grundschule
1977-1978 Mittelschule
1979-1982 Oberschule
1983-1985 Studium der Biologie und Chemie an der Addis Abeba Universität
1986 Deutsche Sprachausbildung in Köthen bei Halle
1987-1993 Studium der Biochemie und Genetik an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
1993-1994 Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
1994-1995 Teilnahme an ausgewählten Vorlesungen an der Humboldt-Universität zu Berlin
1996-2000 Promotion zum Thema: Genetische Analyse des Tyrosinkinase-Rezeptors ErbB2 am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in der AG von Priv. Doz. Dr. Carmen Birchmeier

Veröffentlichung:

Woldeyesus, M. T., S. Britsch, D. Riethmacher, L. Xu, E. Sonnenberg Riethmacher, F. Abou Rebyeh, R. Harvey, P. Caroni and C. Birchmeier (1999). Peripheral nervous system defects in erbB2 mutants following genetic rescue of heart development. Genes Dev **13**(19): 2538-48.

8 Summary

ErbB2 belongs to class I of receptor tyrosine kinases and functions as a co-receptor by the transduction of the neuregulin signal. During embryonic development the ErbB2 gene is expressed in the heart, neural crest, in muscle and epithelial cells (Kokai et al. 1987). Embryos with null mutation of the ErbB2 gene die at midgestation. The mutation causes a morphogenetic defect that results in the absence of trabecules (Lee et al. 1995). In addition the mutant embryos show defects in cranial ganglia and in the primary sympathetic ganglia chain (Lee et al. 1995; Erickson et al. 1997; Britsch et al. 1998).

The heart specific expression of ErbB2 cDNA allowed the mutant animals to survive till birth. This enables me to study the late function of the receptor. In rescued ErbB2^{-/-} embryos the ventricular trabecules, which are finger-like extensions of the myocardium, form properly between E9 and E10 of embryonic development. At late stages of intrauterine development the hearts of the rescued animals showed an overall normal growth.

ErbB2^{-/-} embryos lack Schwann cells along peripheral nerves. The absence of Schwann cells leads to enormous degeneration of sensory and motoneurons. Whereas sensory neurons show an early dependency on neurotrophic factors produced by Schwann cells, motoneurons revealed requirement of these factors during the late phase of their development. Moreover it is known that sensory and motoneurons require neurotrophic factors which are produced by their target tissues such as muscle.

Motoneurons at the thoracic level of the spinal cord are minimally affected, whereas the degeneration of motoneurons at cervical and lumbar segments of the spinal cord are pronounced. This indicates that different motoneuron types differ in their dependency on neurotrophic signals. Furthermore axons of peripheral nerves in ErbB2^{-/-}R (rescued) animals show defasciculation and desorganization. Nervous phrenicus, that innervates the diaphragm muscle retracts and degenerates entirely at E17 of embryonic development. As a result newborn animals can not breathe and die shortly after birth. Surprisingly, the expression and aggregation of AchRs (Acetylcholine Receptors) take place in rescued ErbB2^{-/-}R embryos. The overall phenotype of ErbB2^{-/-}R embryos is very similar to that of ErbB3^{-/-} embryos. This substantiates the essential function of ErbB2 as the functional co-receptor for ErbB3 to transmit the neuregulin signal.